

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоінформатики**

«На правах рукопису»  
УДК 581.1

До захисту допущено:  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Світлана, ГОРОБЕЦЬ  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**Магістерська дисертація  
на здобуття ступеня магістра  
за освітньо-професійною програмою «Біотехнологія»  
зі спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»  
на тему: «ВПЛИВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ДЕСАТУРАЗ ЦІАНОБАКТЕРІЙ  
У ТРАНСГЕННОГО ТЮТЮНУ НА СТІЙКІСТЬ РОСЛИНИ ДО  
УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ»**

Виконав:

студент VI курсу, групи БМ-91мп  
Золочевський Максим Юрійович \_\_\_\_\_

Науковий керівник:

Ас.каф. біоінформатики, к.т.н.  
Дем'яненко Ірина Володимирівна \_\_\_\_\_

Консультант з експериментальної частини:

провідний інженер відділу генетичної інженерії  
ІКБГІ НАН України  
Кирпа Т.М \_\_\_\_\_

Рецензент:

Завідувач відділу загальної та молекулярної  
патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України, д.м.н.  
Досенко Віктор Євгенович \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цій магістерській  
дисертації немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.  
Студент \_\_\_\_\_

Київ – 2020 року

## ВМІСТ

ВСТУП.....	7
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	9
1.1 Особливості <i>Nicotiana tabacum</i> , як модельного організму .....	9
1.2 Галузі застосування тютюну .....	10
1.3 Методи трансформації тютюну.....	13
1.3.1. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація рослин .....	13
1.3.2. Альтернативні методи трансформації.....	18
1.3.3. Інші дослідження, спрямовані на дослідження трансформації <i>Nicotiana Tabacum</i> для підвищення адаптивної здатності рослини .....	20
1.4 Генні конструкції на основі десатураз .....	21
1.4.1. Гени <i>desC</i> та <i>desA</i> ціанобактерій <i>Synechococcus vulcanus</i> та <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 відповідно .....	21
1.4.1. Механізм дії десатураз.....	25
1.4.2 Роль десатураз ЖК у адаптивній здатності рослин .....	30
Висновки до розділу 1 .....	32
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	33
2.1. Об'єкт дослідження.....	33
2.2. Матеріали та обладнання дослідження .....	34
2.2.1 Поживні середовища .....	34
2.2.2 Реактиви та обладнання .....	35
2.3. Методи дослідження .....	36
2.3.1 Трансформація рослин <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - опосередкованим методом.....	36
2.3.2 Полімеразна ланцюгова реакція .....	37
2.3.3. СТАВ-метод виділення ДНК .....	38
2.3.4. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази.....	39
2.3.5. Кількісне визначення активності термостабільної ліхенази.....	39
2.3.6. Визначення активності фермента супероксиддисмутаза .....	40
2.3.7. Визначення рівня втрати електролітів .....	41
2.3.8. Статистичний аналіз.....	41

2.4. Результати та їх обговорення .....	43
2.4.1. Отримання лінії <i>Nicotiana tabacum</i> з експресією генів <i>desC</i> та <i>desA</i> ..	43
2.4.2. Мультиплексний ПЛР-аналіз.....	44
2.4.3. Якісна та кількісна ліхеназні реакції.....	46
2.4.4. Аналіз пошкодження клітинної мембрани та вихід електролитів.....	49
2.4.5. Аналіз активності супероксиддисмутази .....	50
2.4.6. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії.....	52
Висновки до розділу 2 .....	54
3 СТАРТАП ПРОЕКТ .....	55
3.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей.....	55
3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху .....	58
3.3. Визначення ключових факторів успіху проекту.....	63
3.3. Визначення потенційних споживачів.....	65
3.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки .....	68
3.6 Оцінка ризиків та страхування розробки .....	75
ВИСНОВКИ .....	81
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	82

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація: 89 с., 27 Таблиця, 17 рис., 75 джерел.

З підвищенням глобальних обсягів промислових викидів, проблема виснаження озонового шару не втрачає актуальності. Ослаблення озонового шару посилює потік сонячної радіації на землю і викликає у живих організмів негативні зміни на клітинному і молекулярному рівнях. Це робить дослідження, спрямовані на підвищення адаптивної здатності рослин до надлишкового опромінювання світлом УФ-спектру, досить перспективними.

Насамперед, адаптаційні можливості та захисні властивості рослинних клітин залежать від складу їх мембранних ліпідів, та фактору переходу жирних кислот (ЖК) з фази гелю у рідкокристалічну.

Мета даної роботи – дослідити вплив експресії генів *desC* та *desA*, що кодують ацил-ліпідну десатуразу, на стійкість трансгенної рослини *Nicotiana tabacum* до впливу УФ-випромінювання.

**Об'єктами дослідження** є ген *desC*, що кодує  $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та ген *desA*, кодуючий  $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, перенесені у тютюн за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації.

**Предмет дослідження** – вплив генів десатураз ЖК ціанобактерій на адаптивну здатність рослини *Nicotiana tabacum* до надмірного УВ.

За допомогою статистичної обробки отриманих у ході дослідження експериментальних даних та їх порівняння з контрольними зразками, було доведено: рівень пошкоджень мембран у рослин, що експресують додаткові гени десатураз – нижчий, ніж у контрольних рослин.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ДЕСАТУРАЗИ ЖИРНИХ КИСЛОТ, ТЮТЮН, ТРАНСФОРМАЦІЯ, ТРАНСГЕН, ЕКСПЕРСІЯ ГЕНІВ, КЛІТИННІ МЕМБРАНИ

## ABSTRACT

Master's dissertation: 89 pp., 27 tables, 17 fig., 75 sources.

With increasing global industrial emissions, the problem of ozone depletion is still relevant. The weakening of the ozone layer increases the flow of solar radiation to the earth and causes negative changes in living organisms at the cellular and molecular levels. This makes research aimed at improving the adaptive capacity of plants to excessive exposure to UV light spectrum is quite promising.

First of all, the adaptive capacity and protective properties of plant cells depend on the composition of their membrane lipids, and the factor of transition of fatty acids from the gel phase to the liquid crystal phase. This is influenced by the change in the spectrum of acids from saturated to unsaturated due to the formation of double bonds in acid molecules.

The purpose of this work is to study the effect of *desC* and *desA* genes, which express acyl-lipid desaturases on the resistance of *Nicotiana tabacum* plants to the effect of UV light excessive exposure.

The objects of the study are the *desC* gene, which encodes the  $\Delta 9$ -acyl-lipid desaturase of the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, and the *desA* gene, which encodes the  $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 transferred to tobacco by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.

The subject of the study is the influence of cyanobacterial desaturases genes on the adaptive capacity to the UV light of the *Nicotiana tabacum* plant.

By statistical processing of the experimental data obtained during the study and their comparison with control samples, it was proved that the level of membrane damage in plants that are expressing additional desaturase genes is lower than damage of control plants.

**KEY WORDS:** FATTY ACID DESATURASES, TOBACCO, TRANSFORMATION, TRANSGENE, GENE EXPRESSION, CELL MEMBRANES

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ЖК – жирні кислоти

УВ – ультрафіолетове випромінення

УФ – ультрафіолет

СОД – супероксиддисмутаза

ОД – оптична щільність

ФР – фактори розведення

МС – поживне середовищі Мурасіге – Скуга

## ВСТУП

З підвищенням глобальних обсягів промислових викидів, проблема виснаження озонового шару не втрачає актуальності. Ослаблення озонового шару посилює потік сонячної радіації на землю і викликає у живих організмів негативні зміни на клітинному і молекулярному рівнях. Це робить дослідження, спрямовані на підвищення адаптивної здатності рослин до надлишкового опромінювання світлом УФ-спектру, досить перспективними.

Насамперед, адаптаційні можливості та захисні властивості рослинних клітин залежать від складу їх мембранних ліпідів, та фактору переходу жирних кислот (ЖК) з фази гелю у рідкокристалічну. Один із способів збільшити адаптивну здатність організму — зміна спектра ЖК з насичених у ненасичені за рахунок утворення подвійних зв'язків у молекулах ЖК.

**Актуальність.** Ослаблення озонового шару посилює потік сонячної радіації на землю і викликає у живих організмів негативні зміни на клітинному і молекулярному рівнях. За даними озонотричних спостережень, на території України протягом останніх 10 років загальний вміст озону в атмосфері був значно нижчим від кліматичної норми (аналогічна картина спостерігалася для всієї північної півкулі Землі в межах широт 40—60°). Також було зафіксовано кілька випадків зменшення вмісту озону до критичних значень.

Дослідження адаптаційних механізмів до надмірного УФ-випромінювання та розробка трансгенних ліній рослин з підвищеною стійкістю до сонячної радіації є критично важливими для забезпечення аграрних культур на випадок виснаження озоносфери або появи діри в озоновому шарі. Роль десатураз ЖК у адаптивній здатності рослин до температурного та сольового стресу вже неодноразово досліджувалася, на відміну від їх впливу на стійкість до УФ

**Метою роботи** є дослідження впливу експресії генів *desC* та *desA*, що кодують ацил-ліпідні десатурази, на стійкість рослин *Nicotiana tabacum* до впливу UV.

Відповідно до мети дослідження поставлені наступні **завдання**:

1. Отримати сталу трансгенну рослину тютюну, що експресує гени *desC* та *desA*.
2. Підтвердити вплив експресії генів *desC* та *desA* на адаптивну здатність *Nicotiana tabacum* до УФ-випромінювання
3. Дослідити вплив вирощування рослин тютюну в умовах *in vivo* на експресію десатураз
4. Розробити стартап проєкт

**Предмет дослідження** – вплив генів десатураз ЖК ціанобактерій на адаптивну здатність рослини *Nicotiana tabacum* до надмірного УВ.

**Об’єкт дослідження** – ген *desC*, що кодує  $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та ген *desA*, кодуючий  $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis sp.* PCC 6803, перенесені у тютюн за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації.

**Практичне значення роботи.** Результати цієї роботи будуть використані як основа для створення трансгенних ліній інших видів рослин, що несуть гени *desA* та *desC* і подальших досліджень у напрямку підвищення стійкості до абіотичних факторів.

**Наукова новизна.** Вперше було встановлено, що гени *desC* ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та *desA* ціанобактерії *Synechocystis sp.* PCC 6803, що кодують десатурази жирних кислот, підвищують стійкість рослини *Nicotiana tabacum* до ультрафіолетового випромінювання.



## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Особливості *Nicotiana tabacum*, як модельного організму

Рослина *Nicotiana tabacum* відноситься до порядку трубкоцвітних, родини пасльонових, яка містить більш ніж 2000 видів рослин, що в свою чергу належать до 85 родів. Рід *Nicotiana* отримав свою назву у 1586 році, перший повноцінний ботанічний опис – у 1719 році, а у 1753 – своє місце у ботанічній системі Ліннея. Наразі, у складі роду *Nicotiana* знаходиться 70 видів рослин. Розповсюджені ці рослини переважно в Америці, Австралії, Африці, меншою мірою - у Євразії.

*Nicotiana tabacum* не зустрічається у своєму первинному дикому вигляді, адже у його еволюції вирішальну роль мала штучна селекція. Вважається, що окультурення рослини відбулося в 4-5 тисячолітті до н.е на території сучасної Болівії та Перу, після чого вона була розповсюджена по території американського континенту, та згодом по Євразії та Африці. [1]

*Nicotiana tabacum* є важливою рослиною для досліджень у галузях біотехнології та молекулярної біології за рядом причин. З тютюном порівняно легко працювати в селекційних цілях, адже рослина має просту будову квітів, численні насіння, які легко зберігаються, і готову здатність до самозапилення та перехресного запилення [2]. Також доволі швидко росте в умовах *in vitro* та не примхливий до умов вирощування *in vivo*. Трансгенні рослини тютюну широко використовують для вивчення молекулярної генетики [3] та передачі генів, що кодують сполуки-гербіциди [4.], впливають на стійкість до вірусів, шкідників та факторів абіотичного стресу [5]. Крім того, його використовують для виробництва фармацевтичних препаратів та інших хімічних речовин за допомогою біофармінгу (molecular pharming) [6].

Тютюн є популярним модельним організмом у біотехнологічних дослідженнях, який легко піддається генній інженерії завдяки певному ряду факторів та агрономічних властивостей:

- повністю секвенований геном;

- великий приріст біомаси з високим рівнем розчинних білків;
- швидкий життєвий цикл;
- докладно вивчена фізіологія [7].

## 1.2 Галузі застосування тютюну

Листя *Nicotiana tabacum* є основною сировиною тютюнової промисловості, а за рівнем капіталізації у галузі непродовольчого агропромислового комплексу ділить перше місце з бавовною. У 2012 році майже 7,5 мільйонів тон тютюну було вирощено майже на 4,3 мільйонах гектар сільськогосподарських угідь. Китай є світовим лідером у виробництві тютюну – на його території у 2012 році було вирощено 3,2 мільйона тон тютюну (Рисунок 1.1). [8]

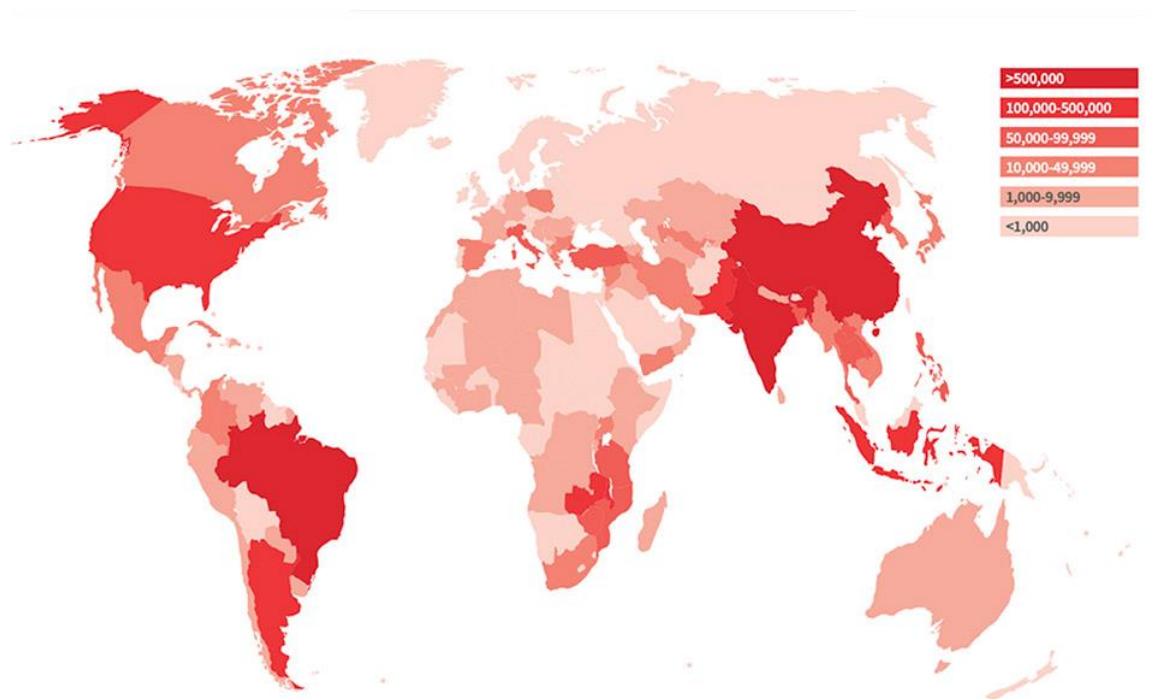


Рисунок 1.1 – Вирощування тютюну в світі (в метричних тонах) [9]

З відходів тютюнової промисловості екстрагують алкалоїд нікотин, який широко використовується в сільському господарстві в якості інсектициду для боротьби з комахами-шкідниками. Насіння *Nicotiana tabacum* не містить

нікотину, тож рафінована олія насіння використовується як заміник олії арахісу чи рапсу в якості біопалива та у виробництві олійних фарб та лаків. [10]

Насіння цієї рослини містять багато олії, яку можна використовувати для виробництва біодизелю. Жирні кислоти (таблиця 1.1) становлять 30-40 відсотків від сухої ваги насіння, а його енергетичний потенціал та придатність підтвердили майже 20 років тому.

Таблиця 1.1. Середні значення масових часток ЖК у складі мембранних ліпідів *Nicotiana tabacum* «дикого типу» [11]

C16:0	C16:1	C18:0	C18:2	C18:3
21,1±0,8	1,6±0,8	1,1±0,5	18,5±5,3	57,5±5,7

Найчастіше для отримання олії використовують сорт Солярис, який практично не містить нікотину, відрізняється невеликим розміром рослин і великою кількістю квіток [12].

У Європі найбільшим виробником тютюну є Італія, де в цей час активно набирають обсяги вирощування Соляріса в центральних і північних регіонах країни, адже у стратегії ЄС щодо зниження викидів вуглекислого газу саме біопаливу відводиться значна роль. В якості олійної культури, у тютюну є важлива перевага перед іншими традиційними культурами, що використовують для виробництва біопалива: вирощування тютюну не конкурує з харчовою промисловістю. Тож великі сільськогосподарські площі, вже зайняті під тютюн в безлічі країн, дозволили б локально збільшити виробництво біопалива та мінімізувати витрати на логістику [13].

Крім насіння, для виробництва олії можна також використовувати листя. Зазвичай в листі тютюну міститься незначна кількість жирів, проте останні дослідження дали змогу розробити новий спосіб підвищити вміст триацилгліцеридів в листі ГМ-тютюну до 15%. Досягти цього стало можливим шляхом генної інженерії та внесення у рослину генів, які відповідають за

синтез ферментів, що стабілізують ліпідні формування та в нормі працюють лише в насінні. Тютюн відрізняється великою кількістю зеленої біомаси, тож вирощування такого трансгенного сорту має економічні переваги. [14]

Генетично модифікований тутюн використовують в якості продуцента рекомбінантних білків: від простих пептидів до складних мультимерних молекул, таких як гемоглобін або секреторні антитіла. Велика кількість цих білків мають терапевтичне або промислове використання. [15]

Крім антитіл, рослинні біотехнологічні платформи можуть значно спростити виробництво противірусних вакцин. Більшість традиційних вакцин являють собою вбитий або інгібований штам вірусу, або навіть частини вірусної оболонки. Стандартна технологія передбачає культивування вірусів у курячих ембріонах [16]. Однак, для ефективної імунізації достатньо вірусоподібної частинки, що складається лише зі структурних поверхневих білків, але не містить генетичного матеріалу. У порівнянні з живими вакцинами, такі «порожні оболонки» абсолютно безпечні, тому що не можуть розмножуватися, а їх виробництво набагато дешевше [17].

Ще одна перевага вакцин на основі рекомбінантних вірусоподібних частинок — висока швидкість їх розробки та виробництва, порівняно зі стандартними методами [18]. У цьому сенсі технологія добре підходить для сезонних захворювань, таких як грип. Нещодавно канадська компанія Medicago, Inc. оголосила фінальну стадію створення заводу з виробництва вакцин на основі трансгенного тутюну [19]. Орієнтовна потужність заводу коливається в рамках 40–50 мільйонів доз чотиривалентної вакцини проти сезонного грипу щорічно. У 2012 році Medicago, Inc. за місяць виготовила 10 мільйонів доз вакцини від грипу на замовлення американського оборонного агентства DARPA, використовуючи технологію біотехнологічної платформи на основі *Nicotiana tabacum* [20].

Kentucky Bioprocessing, LLC з Оуенсборо, штат Кентуккі, США є основним виробником антитіл Zmapp™ до вірусу Ебола на основі тутюну та має досвід виробництва численних продуктів на основі трансгенного *Nicotiana*

*tabacum* за допомогою агроінфільтрації. У 2009 р. на базі Kentucky Bioprocessing успішно виготовили 100 000 функціональних доз інгібітора ВІЛ-1 «Griffithsin», який виробляли з використанням 9300 рослин *Nicotiana tabacum* у якості біофабрик. [21].

Канадська біотехнологічна компанія PlantForm запатентувала платформу на основі трансгенного *Nicotiana tabacum* здатну синтезувати герцептин (ліки, що використовують при лікуванні раку грудей). Цей спосіб дозволив знизити собівартість препарату у 10 разів [22].

Розвиток методів генетичної трансформації рослин розширив спектр експериментальних можливостей, різноманіття цільових клітин та генів, а також мінімізував витрати часу та бюджету дослідників. Ця тенденція надає рослинним біотехнологічним платформам статус надзвичайно привабливого та потужного інструменту для підсилення агропромислового комплексу та розв'язання різноманітних проблем у сфері медицини. Дослідження тютюну сприяли накопиченню нових знань в галузях цитології, гістології та молекулярної біології рослин.

Підсумовуючи наведені дані можна однозначно сказати про надзвичайну цінність культури *Nicotiana tabacum* для біотехнології, молекулярної біології та фармакології [23,24].

### 1.3 Методи трансформації тютюну

Для доставки чужорідних генів в ядерний геном рослин найчастіше використовуються два підходи: векторне перенесення за допомогою великої мегаплазмиди (Ті-плазмиди) агробактерії *Agrobacterium tumefaciens* (переважно для дводольних рослин) і пряме перенесення за допомогою генетичної гармати - для однодольних [25]

#### 1.3.1. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин

При використанні методу агробактеріальної трансформації гени, що представляють інтерес для дослідника, клонуються між двома непрямыми крайовими повторами (лівим і правим) T-області великої мегаплазміди *A. tumefaciens*. Саме по ділянкам повторів відбувається вирізання генів, укладених в ділянці мегаплазміди, які надалі і переносяться в ядро рослинної клітини. [26]

Рід *Agrobacterium* — група грамнегативних аеробних паличок. Бактерії роду *Agrobacterium* віднесені до четвертої групи типу *Gracilicutes* - грамнегативні аеробні (або мікроаерофільні) палички та коки. Нині рід *Agrobacterium* включає 11 видів і 13 геномовідов в складі комплексу *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium sp.* є одним з найбільш широко використовуваних методів для отримання трансгенних рослин, оскільки він має можливість передачі та інтеграції власного T-ДНК у геном рослин [27].

У природних умовах *Agrobacterium tumefaciens* викликає в рослинах-господарях пухлини з назвою «корончасті галли». Корончасті галли виникають через порушення гормонального балансу, їх клітини необмежено ростуть навіть за відсутності рослинних гормонів і зберігають свої властивості навіть при елімінації бактерії. *A. rhizogenes* викликає у рослин формування безлічі додаткових коренів («бородаті коріння»). Ці відхилення зумовлені наявністю в клітині бактерії так званих Ti-і Ri-плазмід, які і роблять агробактерії зручним інструментом у біотехнології.

Ti- і Ri-плазміди (Рисунок 1.2) являють собою кільцеву двониткову ДНК з 12-22 т.п.о. До складу плазмід входять так звана T-ДНК, що кодує ферменти синтезу опінів і фітогормонів; Vir-область, що кодує відповідальні за перенесення T-ДНК в рослину гени; гени утилізації опінів; локуси *ori* забезпечуючі реплікацію плазміди і контролюючі підтримку плазміди в бактеріальній клітині, та *tra* — контролюючий кон'югацію бактерій ген. [28]

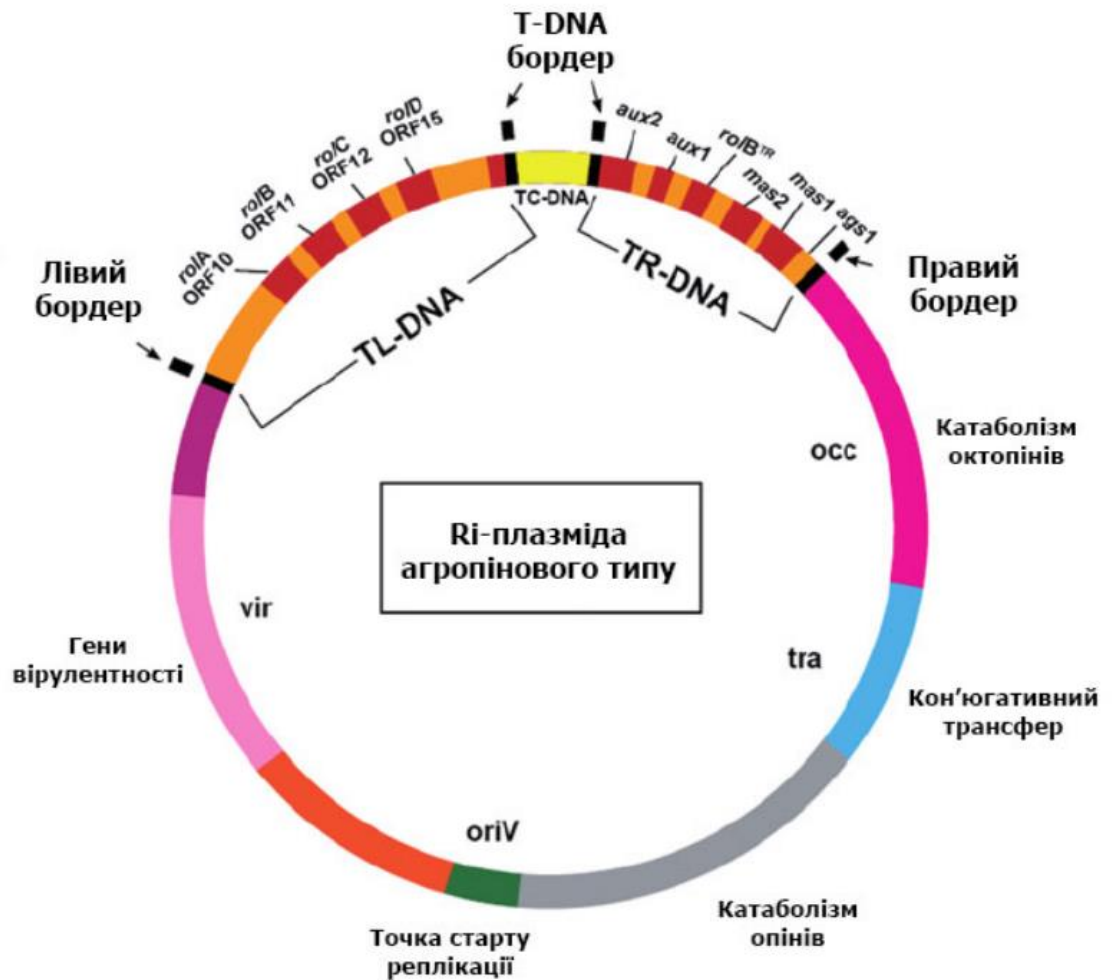


Рисунок 1.2 — Схематичне зображення Ri-плазміді агропінового типу *Agrobacterium tumefaciens* [28]

Процес агробактеріальної трансформації можна розділити на 4 етапи (Рисунок 1.3) [29]:

- 1) прикріплення бактерії до стінки рослинної клітини;
- 2) вирізання Т-ДНК і проникнення її всередину рослинної клітини;
- 3) інтеграція Т-ДНК в геном рослини;
- 4) експресія Т-ДНК.



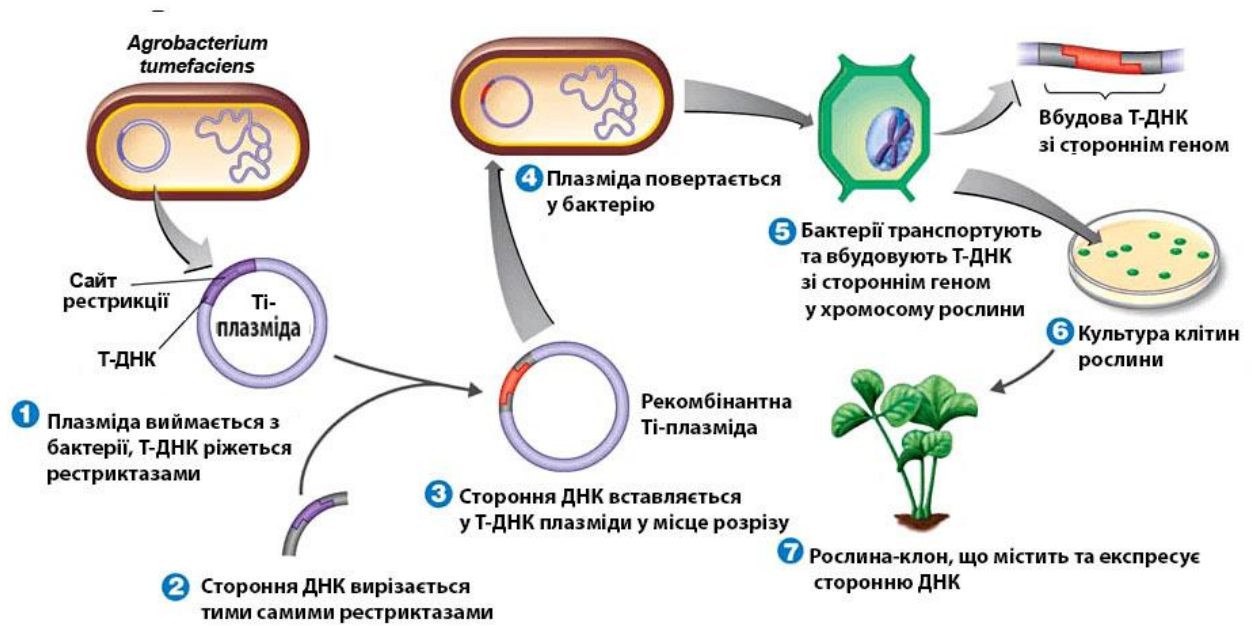


Рисунок 1.3 — Схема трансформації рослин опосередкованим методом за допомогою агробактерії *Agrobacterium tumefaciens*. [33]

Бактерія прикріплюється до клітки латерально, іноді — полярно. У процесі беруть участь: рикадгезин, поліпептид 34-38, транспортні білки, лектини, целюлозні фібрили, сукціноглюкан. Бактерії можуть проходити через клітинну стінку, локально лізуючи її, або через природні отвори, де відсутня або розтягнута вторинна клітинна стінка. Для лізису потрібен VirB1, який може розривати 1,4- $\beta$ -глікозидний зв'язок. З' кінєць цього білка розташовується на зовнішній мембрані бактерії, формуючи агрегати або короткі пілеподібні структури на полюсі. Продукти VirB (11 білків) формують структури, що нагадують статеві ворсинки *E. coli*. АТФаза VirB11, необхідна для трансфекції Т-ДНК з бактерії до рослини, знаходиться на внутрішній мембрані клітин бактерій. Решта протеїнів VirB локалізуються на бактеріальній оболонці або всередині мембрани, формуючи канал для Т-ДНК [30].

Інсерція Т-ДНК в рослинну хромосому проходить у декілька кроків. Існує гомологія між рослинною ДНК по обидва боки від сайту інтеграції й зовнішнім відносно до точок вирізання Т-ДНК областям плазмід. Механізм вбудовування схожий з гомологічною рекомбінацією. При перенесенні



можуть виникати делеції та інсерції близьких послідовностей. Гени Т-ДНК мають власні промотори, що транскрибуються ферментами господаря. Якщо немає перебудов при інтеграції, гени Т-ДНК і маркери, введені в неї, успадковуються згідно законів Менделя, моногенно та домінантно. [31]

У генній інженерії введення генів безпосередньо за допомогою Ті-плазмиди не використовується, оскільки призводить до утворення пухлинних клітин, з яких неможливо отримати цілу рослину. Замість цього використовують векторні молекули на основі Ті-плазмід з видаленими онкогенами. У вектор вбудовують послідовності ДНК, що клонуються. Сайти рестрикції розташовані в штучній Т-області. Як селективні маркери в цих плазмідах використовують гени стійкості до антибіотиків або гербіцидів, які дозволяють відбирати трансформовані клітини рослин.

Т-сегмент вирізають з Ті-плазмиди рестриктазами, вбудовують в стандартний плазмідний вектор для *E.coli*. Він містить плазмиду рBR322, в яку і вбудовують ділянку Ті-плазмиди. У *E.coli* вектор клонується, потім плазміда виділяється. В Т-сегмент по сайтах рестрикції вбудовують певний ген. Потім вектор знову розмножують в *E.coli*, вводять в *A. tumefaciens* з повною Ті-плазмідною. Внаслідок гомологічної рекомбінації Т-ДНК з чужим геном вбудовується в Ті-плазмиди, заміщаючи нормальну Т-ДНК. [32]

Потім за допомогою *vir*-генів відбувається перенесення генно-інженерної конструкції в клітини рослин. Інтеграція рекомбінантної ДНК відбувається випадковим чином з невеликим пріоритетом ділянок активно транскрибованих генів. Можливе вбудовування декількох копій Т-ДНК. [34]

Встановлено, що на всіх стадіях процесингу Т-ДНК можуть відбуватися помилки, що призводять до вирізання разом з Т-ДНК і ділянок (фрагментів) векторної ДНК. Також відомо, що послідовності внутрішніх ділянок Т-ДНК, прилеглі до кінцевих повторів, також відіграють важливу роль у процесингу. Так, наприклад, видалення районів Т-ДНК, прилеглих до лівого або правого кордонів Т-ділянок та заміна їх на фрагменти ДНК з випадковими

послідовностями нуклеотидів призводить до суттєвого зростання числа помилок впізнавання кордонів Т-ДНК. [35]

Отже, при агробактеріальній трансформації в ядерний геном рослин одночасно з трансгенами можуть бути також перенесені фрагменти векторної ДНК. Перенесення векторних послідовностей є частиною механізму перенесення Т-ДНК, що необхідно брати до уваги при отриманні трансгенних рослин. [36]

### **1.3.2. Альтернативні методи трансформації**

Біобалістичний метод, який є одним з найефективніших на сьогодні методів трансформації однодольних, може також з успіхом застосовуватися на дводольних, в тому числі на табаку. В якості вихідного матеріалу для трансформації береться суспензійна культура, калусна тканина або культивовані незрілі зародки рослини. Суть методу полягає в тому, що на найдрібніші частинки вольфраму, платини або золота діаметром 0,6-1,2 мкм напильюється ДНК вектора, що містить необхідну для трансформування генну конструкцію. Вольфрамові платинові або золоті частинки, що несуть ДНК, на целофановій підкладці поміщаються всередину біобалістичної гармати. Калус або суспензія клітин вноситься в чашку Петрі і поміщається під біобалістичну гармату на відстані 10-15 см. У гарматі вакуумною помпою зменшується тиск до 0,1 атм. У момент скидання тиску вольфрамові або золоті частинки з величезною швидкістю викидаються з гармати та розриваючи клітинні стінки, входять у цитоплазму і ядро клітин. Зазвичай клітини, розташовані безпосередньо по центру, гинуть через велику кількість та тиск вольфрамових або золотих частинок, в той час, як в зоні 0,6-1 см від центру знаходитимуться трансформовані клітини. Далі клітини обережно переносять на середу для подальшого культивування та регенерації.

Ефективність трансформації для різних об'єктів в експериментах становить від 1% до 3% (після оптимізації методу), в окремих випадках

досягає 18,1%. Слід зазначити, що число копій ввідного гена на рослинний геном при бомбардуванні досить важко визначити, причому більшість цих копій представлені у вигляді неповних послідовностей, що може призводити до небажаних наслідків, в тому числі й до сайленсингу генів. Ще одним недоліком балістичного методу є обмежені розміри генетичних конструкцій, що переносяться до реципієнта. Загалом, вдається перенести ДНК розміром не більше 10 тисяч пар основ. Плазмідні більшого розміру погано закріплюються на металевих частинках або руйнуються при «бомбардуванні». [37, 38]

Інший розповсюджений метод модифікації *Nicotiana tabacum* — трансформація рослинних протопластів. При обробці клітинної стінки рослини ферментами (целюлазою, пектиназою) клітинна оболонка руйнується і залишається один протопласт. Розроблено методи прямої трансформації протопластів за допомогою ДНК. Хоча частота трансформації значно нижче, ніж при агробактеріальній трансформації, метод прямого перенесення має низку переваг. Вектор може не містити спеціальних біологічних сигналів і функцій трансформації (прикордонних областей Т-ДНК). Для трансформації може бути використаний практично будь-який ДНК-вектор, що несе чужорідний ген. При цьому гібридний ген інтегрується в ядерну ДНК рослини та експресується (при наявності відповідних регуляторних областей), особливо в разі прямої ін'єкції в ядро протопласта, використовуючи механізми клітинної рекомбінації. Однак основним недоліком такого методу є вкрай низька частота трансформації, порівняно з агробактеріальним методом. Ефективність методу «прямої» трансформації рослинних протопластів в середньому не перевищує 0,01-0,1% від числа протопластів. Серед його недоліків - складність процедур отримання протопластів і регенерації рослин. Крім того, при культивуванні протопластів *in vitro* висока ймовірність появи соматоклональних варіацій. [39, 40]

Використання *Agrobacterium tumefaciens* має переваги над біобалістичним методом, оскільки збільшує пропорцію стабільних нізкокопійних подій трансформації, може доставляти сегменти ДНК великих

розмірів і не вимагає спеціальних балістичних установок. Саме тому даний метод був обраний для проведення експерименту у даній роботі.

### **1.3.3. Інші дослідження, спрямовані на дослідження трансформації *Nicotiana Tabacum* для підвищення адаптивної здатності рослини**

На базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України також проводилися дослідження впливу експресії десатураз ціанобактерій на підвищення стійкості до абіотичних факторів тютюну, зокрема низьких температур. За результатами даних досліджень, експериментальні дані аналізів виходу електролітів, активності ферменту супероксиддисмутази, рівня накопичення малонового діальдегіду та експресію гена по репортерному білку термостабільної ліхенази, було зроблено висновки щодо вищої адаптивної здатності рослин, трансформованих генами ацил-ліпідних десатураз у порівнянні з контрольними зразками. [41]

Доволі розповсюдженим напрямом досліджень, спрямованих на підвищення адаптивної здатності рослин є трансформації, спрямовані на вбудову у геном організму генів, що експресують речовини, відповідальні за інгібування оксидних радикалів. Наприклад, у дослідженні гени *AANAT* та *HIOMT* були сконструйовані у бінарний вектор експресії рослин *YHu55*. N-ацетилтрансфераза арилалкіламіну (*AANAT*) та O-метилтрансфераза гідроксиіндол (*HIOMT*) є ключовими ферментами у регуляції біосинтезу мелатоніну у ссавців. Результати досліджень показали, що рівень мелатоніну в трансгенних рослинах *YHu55* (що містить ген резистентності до гентаміцину, ген *AANAT* та ген *HIOMT*) був набагато вищим, ніж у контрольних зразках. Вміст мелатоніну в трансгенних рослинах *pZP122* був майже таким самим, як у нетрансгенних рослинах. Фізіологічне визначення антиоксидантних характеристик продемонструвало, що 1) активність загального антиоксиданта,

2) активність супероксиддисмутази (*SOD*), пероксидази (*POD*) та каталази (*CAT*) та 3) вміст глутатіону (*GSH*) підвищений у трансгенній YXu55 рослині, що містять гени AANAT-НІОМТ, у порівнянні з контрольними рослинами (*pZPI22* або нетрансгенними рослинами). В той самий час вміст малональдегіду (МДА) не виявляв значної різниці між трансгенними рослинами та нетрансгенними рослинами. Вищезазначені факти свідчать про підвищення рівня мелатоніну в трансгенних рослинах YXu55, що підвищу адаптивну здатність організму до окисного стресу. [42]

Також неодноразово проводилися дослідження, що свідчили про отримання ліній трансгенного *Nicotiana Tabacum*, що мав більшу стійкість до осмотичних стресів. Трансгенні рослини з підвищеним накопиченням осмопротекторів, виходячи з експериментальних даних, були більш пристосовані до водного стресу, забезпечуючи перспективу для майбутніх досліджень стресових ефектів, які відіграють основну роль у функціональній діяльності рослин. [43]

## 1.4 Генні конструкції на основі десатураз

Десатурази жирних кислот — ферменти, які вводять подвійні зв'язки у вуглеводневі ланцюги жирних кислот, утворюючи ненасичені та поліненасичені жирні кислоти, що впливає на регуляцію плинності клітинних мембран. Таким чином ці ферменти відіграють важливу роль під час процесу адаптації організму до навколишнього середовища. [44]

### 1.4.1. Гени *desC* та *desA* ціанобактерій *Synechococcus vulcanus* та *Synechocystis sp. PCC 6803* відповідно

У даному дослідженні, ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та *Synechocystis sp. PCC 6803* стали джерелом генів десатураз ЖК для подальшої модифікації тютюну. Дані древні організми є доволі витривалими до

абіотичних стресових факторів, мають докладно досліджену фізіологію та повністю секвенований геном.

Мікроорганізми, що об'єднуються під назвою ціанобактерії (*Cyanophyta*), налічують понад 1600 видів різноманітних одноклітинних, колоніальних і нитчастих форм, схожих між собою по ряду істотних ознак.

Всі ціанобактерії здатні здійснювати фотосинтез з виділенням кисню, що відрізняє їх від фотосинтезуючих бактерій, для яких характерний своєрідний тип фотосинтезу: протікає в анаеробних умовах, не супроводжується виділенням кисню.

Ціанобактерії здатні жити внаслідок трансформації енергії світла, тобто вести фотосинтетичний спосіб життя. Фотохімічна активність ціанобактерії локалізована в периферичній області протопласта. У ламелярних утвореннях зосереджені пігменти, відновлювальні ферментні системи та метакроматичні зерна, що містять фосфати. Фотосинтетичне фосфорилювання, та інші первинні реакції фотосинтезу ціанобактерії, пов'язані з пігментами, що знаходяться всередині ламел (хлорофіл і каротиноїди) або поблизу від них (біліхромопротеїди). Пігментний апарат ціанобактерії складається з комбінацій пігментів в залежності від виду. Ефективність пігментного апарату ціанобактерії забезпечується його надзвичайною лабільністю: як склад пігментів, так і їх кількісний вміст можуть різко змінюватися в залежності від умов освітлення, наявності тих чи інших речовин, що визначають спосіб життя (енергетичні та конструктивні процеси) ціанобактерії. [45]

Серед прокаріотів ціанобактерії є єдиними організмами, які беруть участь у кисневому фотосинтезі, що свідчить про їх філогенетичну спорідненість до рослинних пластид [46], що збільшує вірогідність успішного перенесення їх генів у рослини з подальшою експресією.

Ген *desC* (Рисунок 1.5) було виділено з організму *Synechococcus vulcanus* – термофільної ціанобактерії з оптимальною температурою росту 55°C, яка належить до роду *Synechococcus* і являє собою одноклітинну ціанобактерію,

розповсюджену в морському середовищі. Розмір клітин коливається від 0,8 до 1,5 мкм. Фотосинтезуючі коккоїдні клітини переважно містяться в добре освітлених поверхневих водах, де їх може бути дуже багато (зазвичай від 1 000 до 200 000 клітин на мл). Вони є грамнегативними клітинами з високоструктурованими клітинними стінками, які можуть містити виступи на їх поверхні. Електронна мікроскопія часто виявляє наявність фосфатних включень, гранул глікогену і, що важливіше, високоструктурованих карбоксисом (Рисунок 1.4). [47]

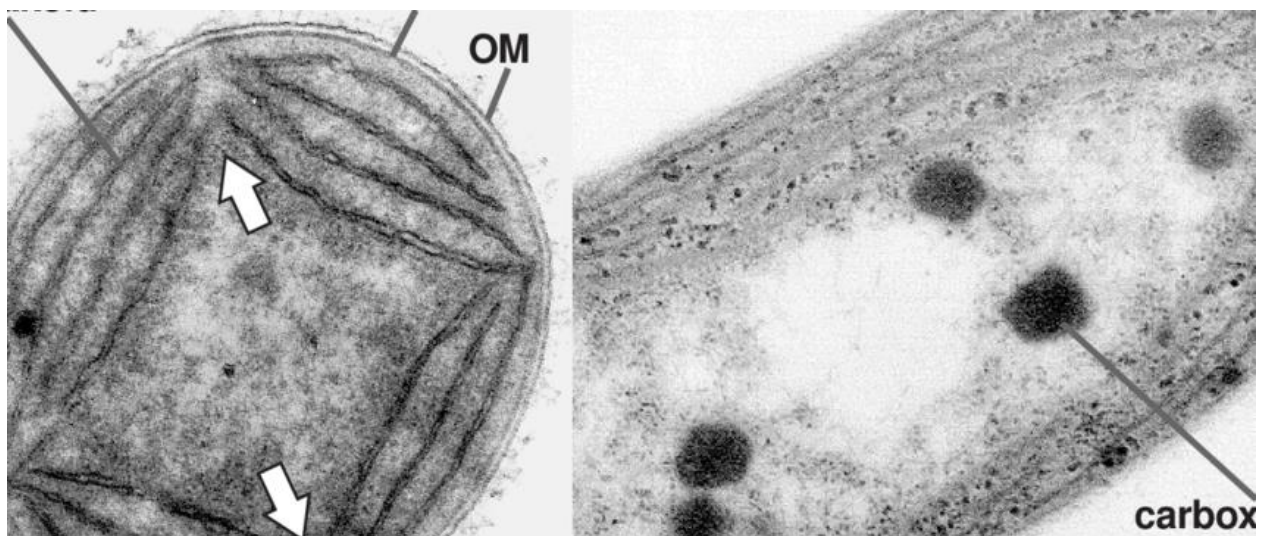


Рисунок 1.4 — Електронна мікрофотографія клітини *Synechococcus* PCC7002 у поперечному та поздовжньому розрізі. На поздовжньому розрізі чітко помітні високоструктуровані карбоксисоми. [48]

Хоча деякі ціанобактерії здатні до фотогетеротрофного або навіть хемогетеротрофного росту, всі морські штами *Synechococcus* є облігатними фотоавтотрофами, які здатні забезпечити свої потреби в азоті, використовуючи нітрат, аміак або, в деяких випадках, сечовину як єдине джерело азоту. [49]

SD

```

CGCATCTAAACTCACAAACGGTGTGAGGAGTACCTATGACATCATCCTTAGAATTGCAA 60
                                M T S S L E L Q 8
CCCCAGACCTCCCGCCTCAATTGGGGCTTTGTCTTCTTTTAGGGGCGGTGCATATTTA 120
P Q T S R L N W G F V F F L G A V H I L 28
GCCGCGGTTCGCTTTTCTTTTCTCCTGGTCGGCATTGGCCGTCACGATCTTTCTGCAC 180
A A V A L F F F S W S A L A V T I F L H 48
TGGCTCTTTGGCAGTATCGGTATTTGCTTGGGATACCATCGTCTTTTAAGTCACCGCAGT 240
W L F G S I G I C L G Y H R L L S H R S 68
TTCCAAGTGCCCAATGGTTGGAGTACGTCAATGCTGTTGTGGGTGCCTTGGCCATGCAG 300
F Q V P Q W L E Y V I A V V G A L A M Q 88
GGAGGCCCGATTTTTTGGGTGGCAGGGCACCCTTACACCATGCCCACTGAGGATGAG 360
G G P I F W V A G H R L H H A H T E D E 108
ATTAAAGATCCCTACTCAGCACGGCGGGGCTTTTGGTGGAGTCATATGCTGTGGCTCGTC 420
I K D P Y S A R R G G F W W S H M L W L V 128
TATCCGAGTCCCAGTTTTTCAATGCCGAGGAGTATGCCCGCTTGGCCCTGACCTCACA 480
Y P Q S Q F F N A E E Y A R F A P D L T 148
CGAGATCCCTTTTACCGCTGGCTAGATCGTACTTTTACTCCTGCAGCTTCCCCTTGCG 540
R D P F Y R W L D R Y F L L L Q L P L A 168
CTGCTCCTCTATGGCTTAGGGGTTGGTCTGCTGTTGTGGGGGATGTTATGCGAGCC 600
L L L Y G L G G W S W L L W G M F M R A 188
GTTTTCTTTGGCAGCACTTGGTTGATTAAGTCTGCCACCCACAAATGGGGCTATCGT 660
V F L W H S T W L I N S A T H K W G Y R 208
CGCTTTGAGACTGAGGATAACTCAGCAATCTCTGGTGGGCAGCCCTCCTCACCTATGGT 720
R F E T E D N S R N L W W A A L L T Y G 228
GAAGGTGGCACAACAACCCATGCTATCCCCACGTGGCCAAGGCGGGCTGGTACTGG 780
E G W H N N H H A Y P H V A K A G W Y W 248
TGGGAAGTGGATCCCACCTGGTGGGTGATTCGCACACTCCAAGGACTCGGTCTTGCCGCC 840
W E V D P T W W V I R T L Q G L G L A A 268
AAGGTACAGTTGCCACCGCCAAAGCGTTGTCCTAATTGCCTCGGCTACGTTGGGCGATC 900
K V Q L P P P K A L S - 279
GCCAGTTGCTCAGCGGATGGAGACCGCCCTCGGTGGTCATTAAGTCTTTCCAAAGA 960
GTCTTCACTTTCTGTCATTGGGCGCTTCTGCCGAGTTTCACCAACGCATCGAGGGCA 1020
TCATACCAAGGCCATTGCTGGCCAATAAATCATACTGTTGCAAGGGG 1068

```

Рисунок 1.5 —Нуклеотидні та амінокислотні послідовності гена *desC*, що кодують десатуразу  $\Delta 9$  у *S. vulcanus*. Збережені залишки гістидину та послідовність ампліфікованого фрагмента ДНК підкреслена. Передбачуваний мотив ShineDalgarno (SD) підкреслений.

Другий використаний при створенні генетичної конструкції ген було виділено із ціанобактерії *Synechocystis sp. PCC 6803*. Являє собою сферичну ціанобактерію, у якої відсутні газові пухирці або оболонка (Рисунок 1.6). *Synechocystis sp. PCC 6803* здатний як до фототрофного росту за допомогою окисного фотосинтезу протягом світлих періодів, так і до гетеротрофного росту за рахунок гліколізу та окисного фосфорилування в темні періоди. Експресія генів регулюється циркадним годинником, і організм може ефективно передбачати переходи між світлою і темною фазами. *Synechocystis sp. PCC 6803* став першим фотосинтезуючим організмом, чий геном було повністю секвеновано. [50]



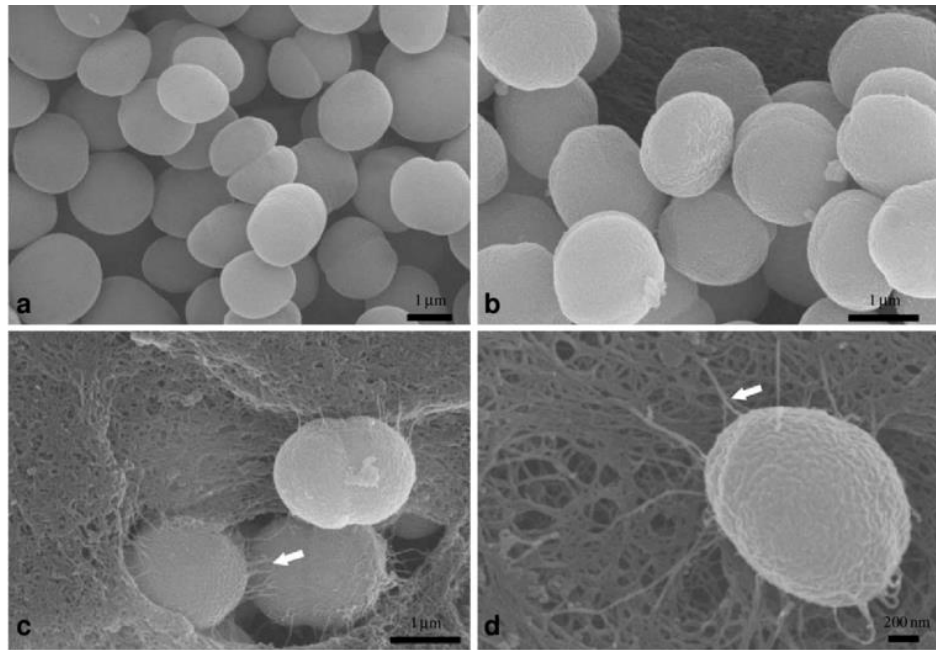


Рисунок 1.6 — SEM-зображення культури *Synechocystis sp. PCC 6803*, зроблені методом хімічної фіксації. Білі стрілки позначають товсті пілі, що виступають із клітини. [51]

У дослідженні для підвищення адаптивної здатності рослини, використовували гени ацил-ліпідних десатураз жирних кислот *desC* ( $\Delta 9$ ) ціанобактерії *Synechococcus vulgaris* та *desA* ( $\Delta 12$ ) ціанобактерії *Synechocystis sp. PCC 6803*, оскільки вони є давніми організмами та мають високу адаптацію до абіотичних стресів.

#### 1.4.1. Механізм дії десатураз

На рисунку 1.7 представлена загальна схема десатурації жирних кислот ацил-ліпідними десатуразами в ціанобактерії *Synechocystis sp. PCC 6803*, де *desA*, *desB*, *desC*, *desD* — назви генів, що кодують зазначені на малюнку десатурази. Назви генів засновані на скороченні *des* (desaturase). Буквені позначення (A, B, C, D) прийняті за хронологією клонування відповідних генів.

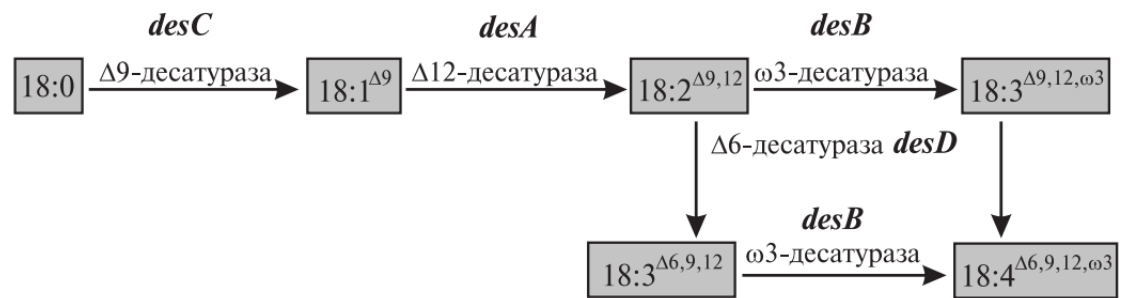


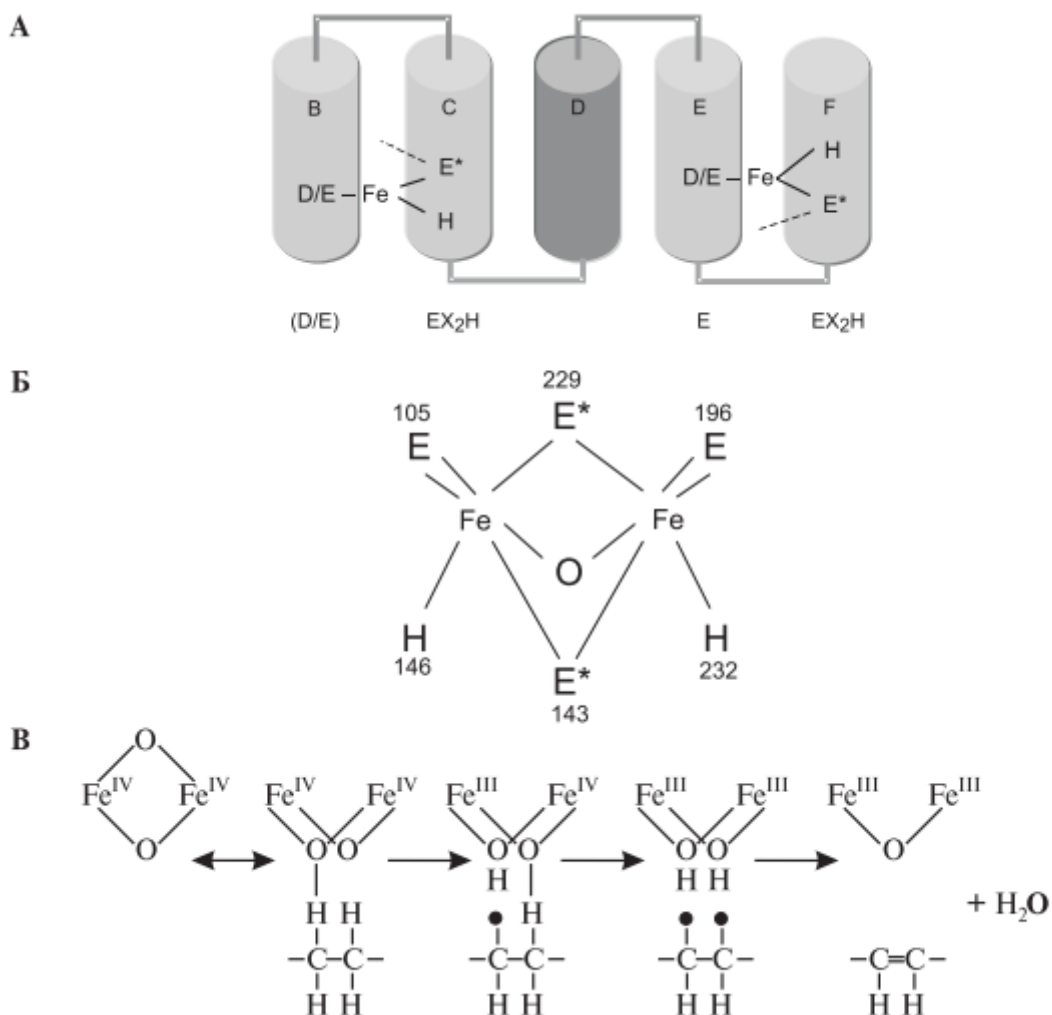
Рисунок 1.7 —  $\Delta 9$ -ацил-ліпідна десатураза (*desC*) перетворює ненасичену стеаринову к-ту у олеїнову к-ту, після чого  $\Delta 12$ -ацил-ліпідна десатураза (*desA*) перетворює олеїнову к-ту у лінолеву кислоту, що відноситься до поліненасичених жирних кислот. [52]

Ненасичені жирні кислоти є важливими складовими полярних гліколіпідів у біологічних мембранах, а рівень ненасиченості ліпідів мембран є критичним у регуляції плинності мембран — фізіологічно важливій характеристиці організму. Вона обумовлюється схильністю мембранних елементів переходити з рідкокристалічної фази у більш тверду фазу гелю, при якій мікрров'язкість збільшується. Це приводить до втрати своїх структурних та функціональних властивостей бішаром, що веде до втрати дієздатності білкових мембранних компонентів, а як наслідок — повного порушення фізіологічних процесів у клітині. [53]

Плинність мембран відіграє важливу фізіологічну роль при адаптації різноманітних організмів до зовнішніх впливів. Подібні явища найдокладніше досліджені у відношенні до термічного стресу. Зазвичай, адаптивні механізми задіюють зміну ліпідного складу мембран, а саме збільшення вмісту ненасичених ліпідів або зменшенні середньої довжини ацильного ланцюга. Подібні зміни ведуть до зменшення щільності упаковки ліпідів у мембрані і таким чином підтримують мікрров'язкість мембран на необхідному рівні [54].

Активні десатурази жирних кислот пов'язують два атома тривалентного заліза, які формують активний комплекс з атомом кисню, що схематично продемонстровано на ілюстрації 1.8. Цей комплекс здатний розривати активні

-C-H- зв'язки та в результаті приводить до утворення подвійних зв'язків  $-C=C-$  в ланцюгах ЖК.



**А.** Розташування кластерів по відношенню до спіральних ділянок білка. Обертання щодо спіралі D формує чотирьохдоменну структуру, в якій атоми заліза знаходяться один над одним. **Б.** Схема залізовв'язуючого центру десатурази. Залишки глутамату ( $E^*$ ), координуючі положення обох атомів заліза в активному центрі, відзначені зірочками. **С.** Передбачуваний шлях десатурації ЖК

Рисунок 1.8 — Організація залізовмісних кластерів в ацил-АПБ-десатуразі

[52]



Десатурази ціанобактерій відносяться до типу ацил-ліпідних десатураз. Десатурація ЖК здійснюється в суворій послідовності: перший подвійний зв'язок утворюється лише в положенні  $\Delta^9$ , другий утворюється в положенні  $\Delta^{12}$  лише в моноєнових ЖК,  $16:1^{\Delta 9}$  або  $18:1^{\Delta 9}$ ; подальша десатурація здійснюється з використанням дієнових ЖК, переважно  $18:2^{\Delta 9,12}$ . Більшість ацил-ліпідних десатураз складаються з 300-50 амінокислотних залишків та являють собою гідрофобні білки, що накопичуються у клітинних мембранах (Рисунок 1.10). Такі ферменти в клітинах ціанобактерій та хлоропластах використовують фередоксин як донор електронів, тоді як ті, що містяться в цитоплазмі рослинних клітин, використовують систему, що складається з цитохрому b5 та NADH: цитохрому b5 оксидоредуктази.

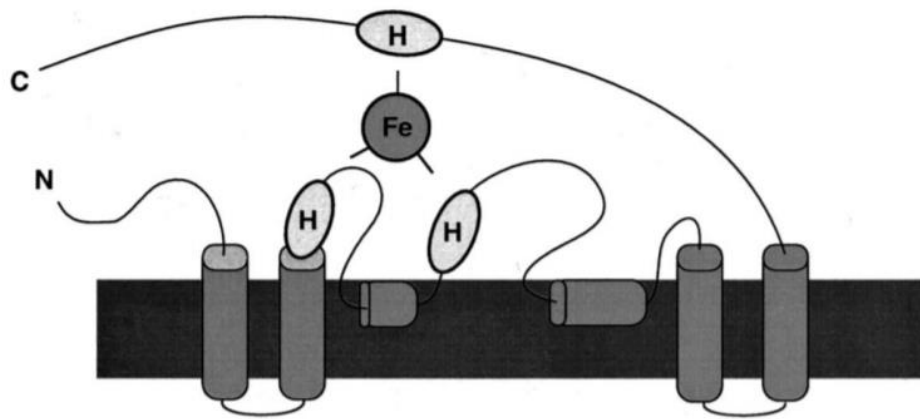


Рисунок 1.10 — Модель розташування ацил-ліпідної десатурази  $\Delta^{12}$  у мембрані на цитоплазматичному боці

Більшість ацил-ліпідних десатураз складаються з 300-500 амінокислотних залишків та являють собою гідрофобні білки. Такі ферменти в клітинах ціанобактерій та хлоропластах використовують фередоксин як донор електронів, тоді як ті, що містяться в цитоплазмі рослинних клітин, використовують систему, що складається з цитохрому b5 та NADH: цитохрому b5 оксидоредуктази. Гени чотирьох окремих десатураз були клоновані з ціанобактерії *Synechocystis sp. PCC 6803*. Ці десатурази вводять подвійні зв'язки у положеннях жирних кислот  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ,  $\Delta 12$  та  $\omega 3$ .

Всі відомі десатурази характеризуються наявністю трьох кластерів гістидину, які локалізовані в сильно збережених положеннях в амінокислотній послідовності кожного білка. Порівняння ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій з відповідними десатуразами вищих рослин виявляє наявність схожих розташованих скупчень гістидину в ферментах усіх типів організму.

Десатурази вищих рослин за механізмом дії діляться на ацил-АПБ і ацил-ліпідні десатурази, що відрізняються між собою за структурою та властивостями. Дані генетичного аналізу показують, що в клітинах рослин присутні кілька типів  $\Delta 9$  десатураз. Відомо, що освіта олеїнової кислоти (18:1 $\Delta 9$ ) відбувається тільки в стромі хлоропластів. Олеїнова кислота, пов'язана з АПБ, може транспортуватися в мембрани як хлоропластів, так і ЕР для подальшої десатурації в ліпід-зв'язаній формі. Згодом ліпіди, що містять поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), транспортуються в плазмалемі. [52].

Ненасичені жирні кислоти є важливою складовою полярних гліколіпідів у біологічних мембранах, а рівень ненасиченості ліпідів мембран є основним фактором у регуляції плинності мембран.

У живих організмах регуляція плинності мембран необхідна для повноцінного функціонування біологічних мембран. Доведено, що рівень експресії десатураз ЖК корелює зі стійкістю та адаптивною здатністю організму до температурного та осмотичного шоку. [41-43]

#### **1.4.2 Роль десатураз ЖК у адаптивній здатності рослин**

Значення ПНЖК в адаптації організмів до мінливих умов навколишнього середовища неодноразово досліджувалося. Вивчення ролі індивідуальних десатураз в адаптації до низьких температур стало можливим завдяки даним про структуру їх генів і можливості генетичного і генетично-інженерного підходів до маніпуляції цими генами в клітинах ціанобактерій. [56]

Шляхом спрямованого мутагенезу була отримана серія мутантів, дефектних по одній або відразу декільком десатуразам. Введення в різні організми генів десатураз дало можливість отримати штами зі зміненим складом ЖК. Таким чином, була відкрита перспектива в дослідженні ролі індивідуальних десатураз і продуктів їх реакції в процесах адаптації біологічних систем до стресових впливів навколишнього середовища.

Шляхом спрямованого мутагенезу була отримана серія мутантів, дефектних по одній або відразу декільком десатуразам. Введення в різні організми генів десатураз дало можливість отримати штами зі зміненим складом ЖК. Таким чином, була відкрита перспектива в дослідженні ролі індивідуальних десатураз і продуктів їх реакції в процесах адаптації біологічних систем до стресових впливів навколишнього середовища.

Мутанти, дефектні по десатуразам ЖК, поведуться по різному при зниженні температури, в залежності від характеру мутації. Так, порушення генів  $\Delta 6$  і  $\omega 3$ -десатураз не впливає на стійкість ціанобактерій до низьких температур. В той самий час, порушення гена  $\Delta 12$ -десатурази знижує холодостійкість. [57]

У вищих рослин стійкість до низьких температур також корелює з наявністю в мембранах ПНЖК. Так, у *A. thaliana* мутанти по генах *fad5* і *fad6* дефектні по синтезу хлоропластних sn-2-пальмітолеїл- $\Delta 12$  і sn1-оле- $\Delta 12$ -десатурази, відповідно, характеризуються хлорозом листя, уповільненням зростання і зміною форми хлоропластів при низьких температурах. У мутанта по гену *fad2* при 16°C знижується швидкість подовження стебла, а при 60°C він гине. Експресія *Fad7* десатурази *A. thaliana* в *Nicotiana tabacum* призводить до підвищення стійкості насіння тютюну до низьких температур. Разом з тим, блокування експресії *Fad7* і синтезу трієнових ЖК в хлоропластах давало змогу рослинам більш ефективно адаптуватися до підвищених температур. [58]

## Висновки до розділу 1

Отже, ацил-ліпідні десатурази впливають на спектр ЖК мембранних ліпідів та як наслідок, регулюють плинність мембран. Плинність мембран є важливим показником в аспекті стійкості мембран до абіотичних стресових факторів, зокрема температурного та осмотичного стресу.

Ген *desC*, що кодує  $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та ген *desA*, кодуючий  $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, є оптимальними об'єктами дослідження, так як не порушують метаболічні шляхи модельної рослини *Nicotiana tabacum*.



## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1. Об'єкт дослідження

В роботі використовували ген *desC*, що кодує  $\Delta 9$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechococcus vulcanus* та ген *desA*, що кодує  $\Delta 12$ -ацил-ліпідну десатуразу ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803, які були трансляційно злиті в одних рамках зчитування з оптимізованою версією *licBM3* репортерного гена термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum*.

Гібридні гени *desA::licBM3* та *desC::licBM3* клонували у вектори на основі pBISN (з селективним геном *nptII* та *bar* відповідно) під контролем 35S промотора ДНК вірусу мозаїки цвітної капусти (35S РНК CaMV) [59]. 5'-кінцева ділянка гена *desC::licBM3* була трансляційно злита в одній рамці зчитування з послідовністю (ген *ats1A Arabidopsis thaliana*), що кодує транзитний пептид малої субодиниці Rubisco для забезпечення сигналу транспорту у хлоропласти. Отриману рекомбінанатну молекулу *ats1A::desC::licBM3* клонували під контролем промотора 35S ДНК CaMV в бінарний вектор з селективним геном *bar*.

Також використовували ген *desA::licBM3*, який клонували у вектор на основі pBISN (з селективним геном *nptII*) під контролем холодоіндукованого промотора CBF1 [60]. В якості контролю використовували трансгенні рослини, з аналогічними векторними конструкціями, що містять замість гена десатурази (*desA* або *desC*) послідовність репортерного гена зеленого флюоресцентного білка медузи *Aequorea victoria* (*gfp*) [61].

У якості піддослідного модельного організму використовували рослину *Nicotiana tabacum*, вирощену методом *in vivo* за температурного режиму +10 – +25°C, освітлення 7 год (11-18), вологість 30-40 %. Досліджували рослини віком 4–5 тижнів. Використовували верхні розкриті листки. В наслідок *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації було отримано три лінії, які експресують ген *desC*, та дві лінії рослин *Nicotiana tabacum*, що

експресують ген *desA* [62]. Як контроль використовували рослини дикого виду та трансформанти, що несуть ген *gfr:licBM3* того ж виду.

## 2.2. Матеріали та обладнання дослідження

### 2.2.1 Поживні середовища

Культивування *in vitro* зразків *Nicotiana tabacum* проводилося на середовищі Мурасіге – Скуга.

#### Склад середовища Мурасіге – Скуга (1000 мл):

- 10х стоковий розчин макросолей ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – 100 мл, х.ч.
- 100х стоковий розчин мікросолей ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) – 1 мл, х.ч.
- 25х стоковий розчин вітамінів (тіамін  $\text{HCl}$ , піридоксин  $\text{HCl}$ , нікотинова кислота, гліцин) – 2 мл, х.ч.
- 20х стоковий розчин Fe хелат ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) – 5 мл, х.ч.
- Інозитол – 100 мг, х.ч.
- Сахароза – 30 г, х.ч.
- Агар – 8 г, х.ч.

Культивування культури *A.tumefaciens* відбувалося у рідкому середовищі LB з додаванням карбеніциліну (50 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л).

#### Склад середовища LB:

- Дріжджовий екстракт - 5 г / л
- Хлористий натрій - 10 г / л
- Триптон - 10 г / л

### 2.2.2 Реактиви та обладнання

Для виконання експериментальної частини роботи використано наступні реактиви: дистильована та деонізована вода, карбеніцилін, рифампіцин, ацетосеренгон, фітогормони BAP та NAA, цефатоксим, канаміцин, фосфінотрицин, ПЛР-мастермікс, буфер TAE та Tris-HCl, бромистий етидій, маркер ДНК O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва), ліхенан ("Sigma", USA), розчин 0,5% Congo-Red, Na<sub>2</sub>EDTA, β-меркаптоетанол, стандартні розчини БСА ("Fermentas"), нітросиній тетразол, метіонін, рибофлавін, метанол, ортоксилол, оцтова кислота, розчин гексадеканової кислоти в гептані.

Лабораторне обладнання:

- Роторна центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R
- Спектрофотометр BioPhotometer v.1.35. (Eppendorf, Німеччина).
- Ампліфікатор 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США)
- Сухожарова шафа 2Ш-0-01 (Медлабортехника, Україна)
- Міні-шейкер Biosan MR-1
- Люмінесцентна лампа T5/G5, модель ELI-230A-T5-8W (Osram, Німеччина)
- Ламінарна шафа
- Іонометр

А також лабораторний посуд: конічні колби, скляні лійки, паперові фільтри, скляні палички, штатив, ділильна лійка, чашки Петрі, скляні банки 200 мл, пробірки "Eppendorf".

## 2.3. Методи дослідження

### 2.3.1 Трансформація рослин *Agrobacterium tumefaciens* - опосередкованим методом.

Генетичну трансформацію проводили з рослинами *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3*. Для трансформації використовували вектор на основі pBISN з селективним геном *nptII*, що містив ген десатурази трансляційно злитий з геном репортерного білка термостабільної ліхенази (*desA::licBM3*) під контролем 35S промотора ДНК ВМЦК. Генетичну трансформацію рослин проводили *Agrobacterium*-опосередкованим методом “листяних дисків” [63].

Нічну культуру *A. tumefaciens* культивували в рідкому середовищі LB з додаванням карбеніциліну (50 мг/л) та рифампіцину (50 мг/л) при 100-150 rpm та 26°C в темряві.

Суспензію бактерій осаджали за допомогою роторної центрифуги (Eppendorf Centrifuge 5415 R) при 5000g протягом 5 хв. Осад розчиняли в рідкому живильному середовищі MS, додавали ацетосеренгон в концентрації 100 мкМ/л та витримували дану суспензію в темряві при +25°C протягом 1,5 год для індукції *vir*-області агробактерії [64]

Як джерело листкових експлантів використовували велике, нормально сформоване листя рослин віком 1-1,5 місяців. Листкові пластинки нарізали на експланти площею 1-1,5 см<sup>2</sup> та поміщали в бактеріальну суспензію.

Суспензію культивували одну годину в термостаті при +25°C в темряві. Потім відбирали експланти, звільняли їх від крапель середовища з резуспендованою бактеріальною культурою та переносили на середовище MS. Кокультивували з агробактерією протягом двох діб при 25°C (до появи зароста агробактерій).

Після кокультивування експланти відмивали в стерильній дистильованій воді, підсушували на стерильному фільтрувальному папері (10-15 хв) та переносили на середовище MS з додаванням фітогормонів BAP

– 1 мг/л та NAA – 0,1 мг/л. Для припинення росту агробактерій додавали 700 мг/л цефатоксиму та селективний маркер канаміцин 100 мг/л або фосфінотрицин 5 мг/л залежно від селективного агенту.

Протягом 2-3 тижнів спостерігали за регенерацією потенційно трансгенних пагонів рослин. Витримували проростки в у культивацийному приміщенні *in vitro* за умов 25±1°C, при 16-годинному фотоперіоді, освітленості 100 мкмоль квантів/(м²с) [65].

### 2.3.2 Полімеразна ланцюгова реакція

Рослинну ДНК виділяли за допомогою СТАВ-методу. Концентрацію виділеної ДНК визначали вимірюванням оптичної густини розчину при довжині хвилі 260 нм за допомогою спектрофотометра BioPhotometer (Erppendorf, Німеччина).

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). З використанням праймерів: *licBM3*-1 (gtcgtaaatacgcctttgttgca) та *licBM3*-2 (gttaggatagtatttcatattcg) для ампліфікації фрагменту гена *licBM3* довжиною 642 п.о.; *desC*-1 (cctcaattggggctttgtcttc) та *desC*-2 (aactgtaccttggcggcaaga) для ампліфікації фрагмента гена *desC* довжиною 777 п.о.; *virD1*-1 (atgtcgcaaggcagtaagccsa) та *virD1*-2 (ggagtctttcagcatggagcaa) для ампліфікації фрагменту гена *virD1* довжиною 432 п.о.; *act*-1 (tttgctggagatgatgc) *act*-2 (cttgaatggcgacatac) для ампліфікації фрагменту гена актину тютюну довжиною 351 п.о. Ампліфікацію проводили в таких умовах: 5 хв 94°C; 30 циклів (30 секунд 94°C; 45 секунд 60°C; 45 секунд 72°C); 5 хв. 72°C.

Продукти ампліфікації розділяли шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі, використовуючи буфер TAE та візуалізували за допомогою бромистого етидію. В якості маркеру ДНК використовували O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва) [66].

### 2.3.3. СТАВ-метод виділення ДНК

В основі методу лежить лізис клітин буфером на основі СТАВ (ЦТАБ - цетілтриметіламмонійбромід, входить до складу багатьох побутових миючих засобів), депротеїнізація хлороформом і осадження ДНК ізопропанолом.

Необхідні реагенти:

СТАВ-буфер: 2% СТАВ (10,0 г), 1,4 М NaCl (40,91 г), 20 мМ ЕДТА (20 мл 0,5 М ЕДТА), 100 мМ Tris-HCl pH 8 (50 мл 1М Tris-HCl) додати дистильовану воду до кінцевого об'єму 500 мл.

ТЕ-буфер: 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЕДТА. Зберігати при 2-8 ° С.

Послідовність виконання:

1. Приблизно 2 см<sup>2</sup> листя покласти в 1,5 мл пробірку.
2. Додати 400 мкл СТАВ 2% буфера і швидко, протягом 30 сек., Подрібнити за допомогою палички-подрібнювача.
3. Додати 10 мкл РНКазі і 5 сек. струсити на струшувачі.
4. Інкубувати 60-80 хв при 65°C на водяній бані або сухому нагрівачі, періодично акуратно збовтувати.
5. Додати 400 мл очисного розчину хлороформ-ізоаміловий спирт (очисний розчин: 92% хлороформу і 8% ізоамілового спирту).
6. Центрифугувати 1 хв при максимальній швидкості (13000 об / хв).
7. Обережно піпеткою відібрати верхню фазу (постаратися не захопити проміжну плівку) і перенести в нову пробірку.
8. Повторити пункти 5-7.
9. Додати 350 мл холодного ізопропанолу і ретельно перемішати розчини не допускаючи енергійного струшування.
10. Центрифугувати 10 хв при максимальній швидкості (13000 об / хв).
11. Ізопропанол акуратно злити, ДНК прополоскати в 70% етанолі.
12. Центрифугувати 5 хв при максимальній швидкості (13000 об / хв).

13. Спирт злити, ДНК залишити у відкритій пробірці для сушки (часто досить близько 1 години).

14. Суху ДНК розчинити в дистильованій воді або TE-буфері.

#### **2.3.4. Якісне визначення активності термостабільної ліхенази**

Екстракцію білків проводили в такому порядку: 100 мг рослинного матеріалу розтирали в ступці з 200 мкл 50 мМ Tris-HCl буфером, центрифугували 5 хв. (10000 g) і відбирали супернатант для аналізу.

Якісне визначення активності ліхенази проводили методом чашкового тесту [67]. У чашки Петрі заливали розчин 2% агарози, що містить 0,05% ліхенану ("Sigma", USA) в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), і формували лунки обсягом 60-80 мкл [68]

Чашки з розчином залишали на 30 хвилин, потім наносили в утворені лунки по 60-70 мкл підготовленого екстракту. Поміщали у сухожарову шафу 2Ш-0-01 при 65°C на 1 год., після чого діставали чашки з екстрактами та здійснювали двохкратне фарбування розчином 0,5% Congo-Red, залишали інкубувати на міні-шейкері Biosan MR-1 на 15 хвилин та проводили візуалізацію результатів.

#### **2.3.5. Кількісне визначення активності термостабільної ліхенази**

Активність ліхенази вимірювали використовуючи ліхенан ("Sigma", USA) в якості субстрата. Концентрацію відновлювальних цукрів визначали за калібрувальним графіком, побудованим по глюкозі.

За одиницю активності брали кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлювальних цукрів (як еквівалент глюкози) за 1 хв ( в перерахунку на 1 мг білка) [69]. Питому активність розраховували на кількість розчинного білка. Для приготування екстрактів сумарного розчинного білка листові експланти гомогенізували в подвійному об'ємі буферу, що містив 0,1 М Tris

– HCl (pH 8.0), 0,005M Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1 M NaCl та 0,01M β-меркаптоетанол. Концентрацію білка визначали за методом Bradford, використовуючи калібрувальну криву побудовану для стандартних розчинів БСА (“Fermentas”) [70].

500 мкл зразка готували таким чином: 10 мкл білкового екстракту + 100 мкл ліхенану (0,5% у воді), доводили водою до 500 мкл. Потім інкубували при 65-70° С 1 год, після чого додавали 500 мкл 1% розчину ДНС та 165 мкл К-На-тартрату 40%, витримували на водяній бані 10 хв при 95-100 °С. Залишали охолоджуватись на льоду (при +4° С), потім 15-20 хв за кімнатної температури [71]

Вимірювати ОД при 510 нм.

### **2.3.6. Визначення активності фермента супероксиддисмутаза**

Аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза за методикою з використанням фотохімічного окислення нітросинього театразолію [72]. Рослинний матеріал (100 мг) поміщали в пробірку Eppendorf (1,5), розтирали з 1 мл 50мМ Tris-HCl буферу та центрифугували при 13000 g (4С) протягом 15 хв. Супернатант використовували для аналізу. Реакцію з нітросинім театразолієм проводили в пробірках Eppendorf (1,5 мл). Реакційна суміш складалась із 10 мкл рослинного екстракту, 540 мкл 50мМ Tris-HCl буферу, 130 мкл 65 мМ метіоніну, 47мкл 630 мкМ нітроголубого театразолію, 12,5мкл 1 мМ рибофлавіну. Одну пробірку для кожного зразка залишали в темряві, іншу освітлювали протягом 5 хв. при 26°С лампою білого кольору (люмінесцентна лампа T5/G5 модель ELI – 230 А – T5 – 8W ).

Вимірювання адсорбції проводили при 550 нм. Реакційну суміш після витримання в темряві, використовували у якості фону для вимірювань зразків, що були витримані на світлі. Вимірювання проводили на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Нульова проба містила всі перелічені



компоненти, за винятком рослинного екстракту, кількість буферу в реакційній суміші нульової проби збільшували до 550 мкл.

$$\text{СОД (од./мл сум)} = (\text{ОД 1} / \text{ОД 2} - 1) (\text{ФР}),$$

- де ОД 1 – оптична щільність нульової проби ;
- ОД 2 – оптична щільність експериментальної проби ;
- ФР – фактори розведення = об'єм реакційної суміші, мл / об'єм використаного рослинного екстракту, мл .

Активність СОД виражали в одиницях акт/мг білка .

### **2.3.7. Визначення рівня втрати електролітів**

рослин відбирали висічки листкових експлантів масою приблизно 100 мг, обмивали в деіонізаті, викладали у флакони по 20 мл та заповнювали їх 20 мл деіонізату. Потім інфільтрували 2 хв. двічі з інтервалом 1 хв. Вміст закритих флаконів ресуспендували на шейкері протягом 1,5–2 год. Після чого визначали загальну кількість – виходу електролітів, потім повертали вміст до флакона, виставляли у водяну баню на 100°C протягом 30 хв. Після проварювань зразків заміри повторювали [73]. Визначали втрату електролітів порівнюючи показники виходу електролітів після дії стресора та загальної кількості електролітів у пробі.

### **2.3.8. Статистичний аналіз**

У всіх експериментах використовували 12 біологічних повторностей, аналітичних 1.

Середнє значення, стандартні відхилення та довірчий інтервал розраховували за допомогою програми Excel Microsoft Office 2010. Достовірність різниці між вибірковими середніми оцінювали за допомогою

парного t-теста Стьюдента. Значення p розраховували за допомогою програми Excel.

### **2.3.9. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії**

Всі рослини використані у дослідженнях були проаналізовані методом газової хроматографії та мас-спектрометрії разом з к.б.н. завідуючим центром колективного користування Остапчуком А. М. та к.б.н., н.с. Хархотою М.О. Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного.

Аналіз спектра ЖК здійснювали методом газової хроматографії та мас-спектрометрії. Виділення ЖК та утворення їх метилових ефірів для проведення газо-хроматографічних аналізів здійснювали одноетапно за модифікованою методикою:

Рослинний матеріал відбирали з верхніх розкритих листків (200 мг), нарізали знежиреними ножицями, поміщали у скляні пробірки. Готували реакційну суміш А – метанол: ортоксилол: оцтова кислота в об'ємному співвідношенні 44:20:2.

Реакційна суміш Б містила розчин внутрішнього стандарту гексадеканової кислоти в гептані. 10мг/мл та гептан у співвідношенні 1:84.

В кожну пробірку додавали 3,3 мл реакційної суміші (А), а потім додавали 1,7 мл реакційної суміші (Б). Пробірки щільно закривали кришками з тефлоновими прокладками, витримували їх на водяній бані при 80°C протягом 2 год. Охолоджували за кімнатної температури, спостерігали розшарування суміші на дві фази.

Відбирали верхню фазу, в якій концентруються утворені метилові ефіри жирних кислот. Відібрані 300 мкл верхньої фази переносили у віалу з якої відбирався зразок для здійснення аналізу газової хроматографії та мас-спектрометрії.

## 2.4. Результати та їх обговорення

### 2.4.1. Отримання лінії *Nicotiana tabacum* з експресією генів *desC* та *desA*

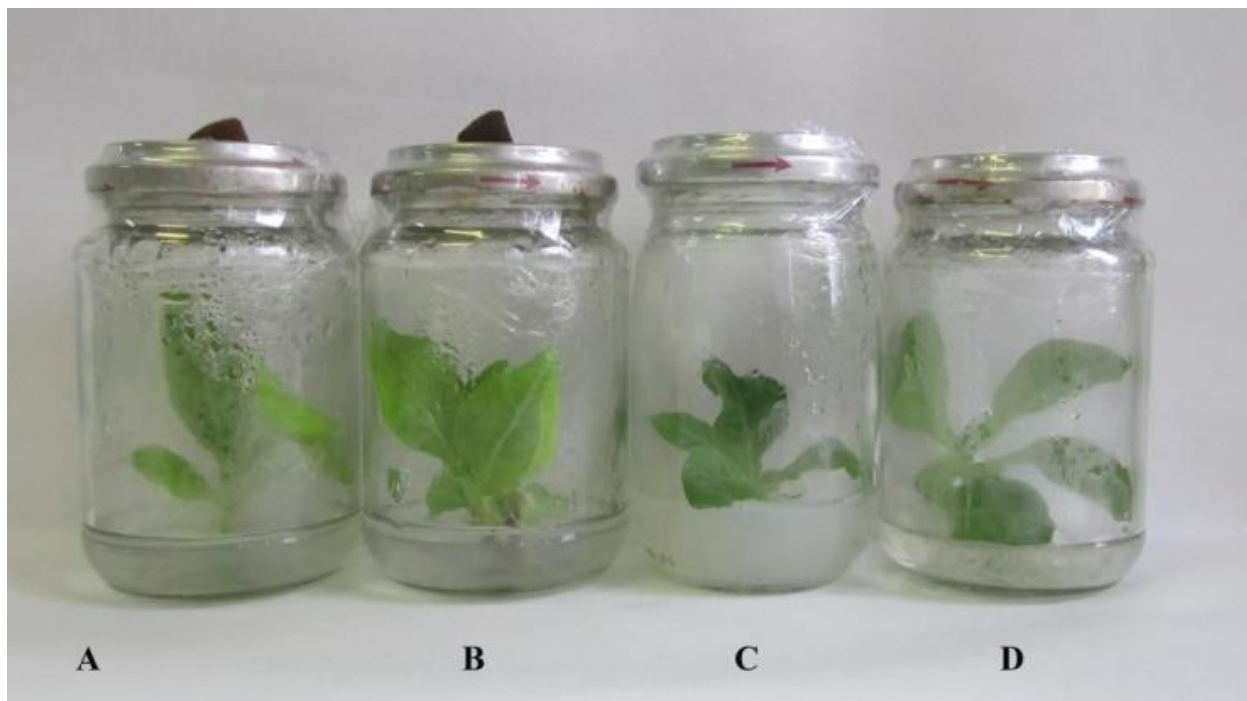
Для трансформації використовували заклонований у плазмиду агробактерії *Agrobacterium tumefaciens* вектор на основі pBISN з селективним геном *nptII*, що містив ген десатурази трансляційно злитий з геном репортерного білка термостабільної ліхенази (*desA::licBM3*) під контролем 35S промотора ДНК ВМЦК. Суспензією з агробактерією, що містить дану генетичну конструкцію, обробляли піддослідні зразки *N. tabacum*, що містять у своєму геномі та експресують гібридний ген *ats1A::desC::licBM3* (Рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 — Листкові паростки *Nicotiana tabacum* після обробки *Agrobacterium tumefaciens*

### 2.4.2. Мультиплексний ПЛР-аналіз

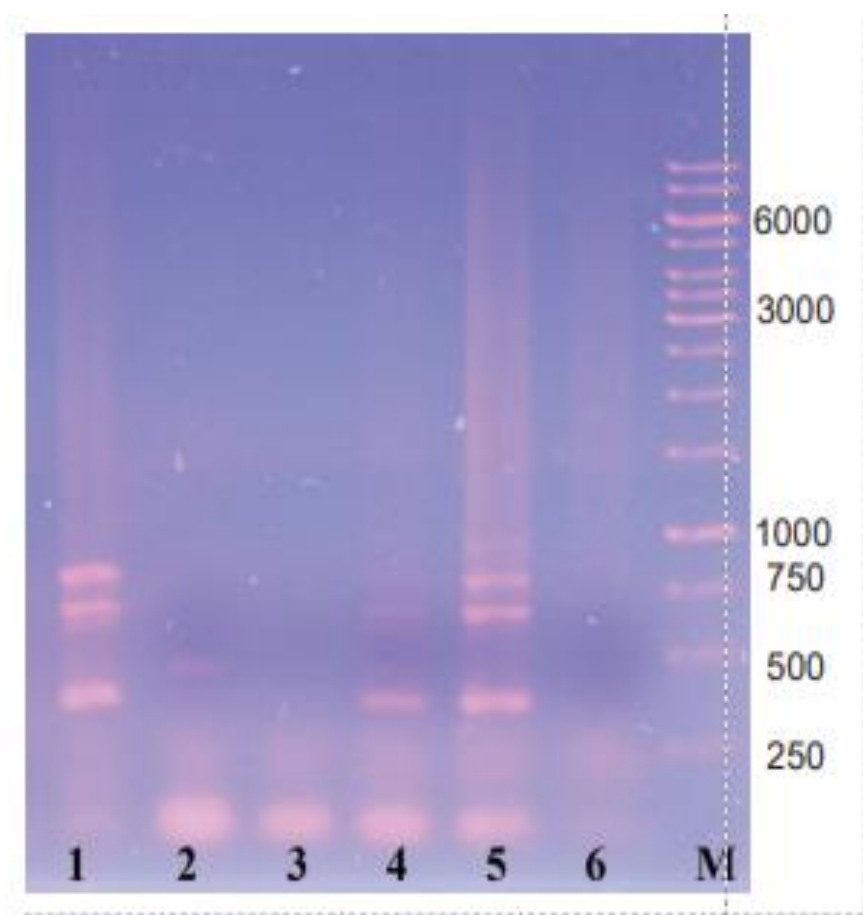
Після 2 тижнів регенерації трансгенних зразків пагонів рослини, була проведена детекція вставки цільових генів *desC* та *desA* за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції та їх експресія за активністю білка репортерного гена термостабільної ліхенази. В якості контролів для цих та у наступних дослідках, використовували *Nicotiana tabacum* «дикого типу» та *N. Tabacum* з експресією гена біфункціонального репортера термостабільної ліхенази *gfr::licBM3* (Рисунок 2.2).



**A** – контрольна рослина *N. tabacum*; **B** – контрольна рослина, що експресує ген біфункціонального репортера *gfr::licBM3*; **C,D** – рослини, що одночасно експресують гени *desA::licBM3* та *ats1A::desC::licBM3*.

Рисунок 2.2 – Процес культивування тютюну

Результати мультиплексного ПЛР-аналізу представлені на рисунку 2.3.



1. *Nicotiana tabacum*, з геном desC :: licBM3:: RTP;
2. контроль virD1;
3. контроль H<sub>2</sub>O;
4. нетрансгенна рослина;
5. трансгенна рослина з генами desC::licBM3::RTP та desA::licBM3;
6. нетрансгенна рослина;
7. (M) ДНК-лінійка 100 bp (desA - 949 bp, desC - 777 bp, licBM3 - 642 bp).

Рисунок 2.3 —Результати мультиплексного ПЛР досліджуваних зразків.

При проведенні ПЛР використовували наступний набір праймерів:

- licBM3-1 (gtcgtaaatacgccttttgttgca) та licBM3-2 (gttaggatagtattttcatattcg) для ампліфікації фрагменту гена licBM3 довжиною 642 п.о.;

- desC-1 (cctcaattggggctttgtcttc) та desC-2 (aactgtaccttggcggcaaga) для ампліфікації фрагмента гена desC довжиною 777 п.о.;
- virD1-1 (atgtcgcaaggcagtaagccca) та virD1-2 (ggagtctttcagcatggagcaa) для ампліфікації фрагменту гена virD1 довжиною 432 п.о.;
- act-1 (tttgctggagatgatgc) act-2 (cttgaatggcgacatac) для ампліфікації фрагменту гена актину тютюну довжиною 351 п.о.

Ампліфікацію проводили при умовах: 5 хв 94°C; 30 циклів (30 секунд 94°C; 45 секунд 60°C; 45 секунд 72°C); 5 хв. 72°C.

### 2.4.3. Якісна та кількісна ліхеназні реакції

Для підтвердження експресії генів *desC* та *desA*, які знаходяться в одній рамці зчитування з геном ферменту ліхенази, проводили якісне визначення активності термостабільної ліхенази за допомогою методу чашкового тесту. Результати представлені на рисунку 2.4. Світлі ділянки навколо лунок на середовищі свідчать про гідроліз ліхенана, який підтверджує експресію репортерного гену.

Кількісне визначення активності ферменту проводили, вимірюючи кількість вільних відновлювальних цукрів після реактивації білкових екстрактів тканин піддослідних рослин з ліхенаном та опромінення зразків люмінесцентною лампою OSRAM T5/G5. Зразки опромінювали відповідно по 1 хвилині, 5 хвилин, 10 хвилин.



Рисунок 2.4 — Якісна ліхеназна реакція. **1** - позитивний контроль; **8** — негативний контроль; **2-6** — екстракт рослин, що одночасно експресують гени *desC::licBM3* і *desA::licBM3*

Концентрацію цукрів визначали за калібрувальним графіком для глюкози, оптичну густину вимірювали при 510 нм. За одиницю активності приймали активність ферменту, що утворює 1 мкмоль відновлювальних цукрів за 1 секунду. Питому активність розраховували на кількість білку. Результати на рисунку 2.5 та таблиці 2.1.

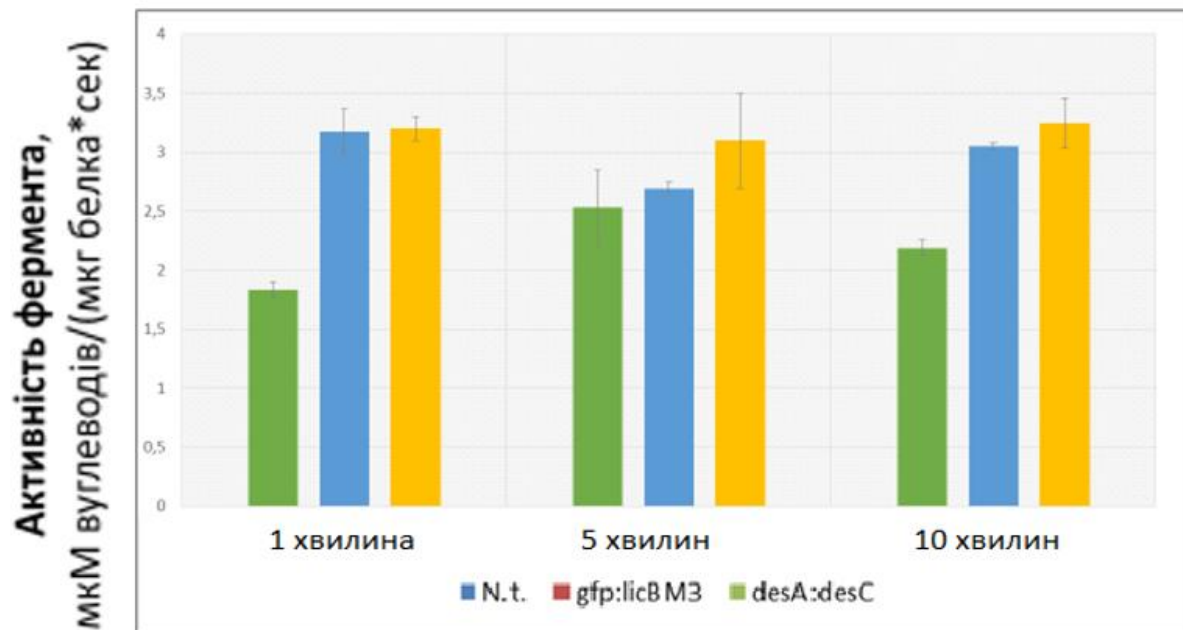


Рисунок 2.5 — Кількісне визначення термостабільної ліхенази

Таблиця 2.1. Кількісне визначення термостабільної ліхенази у зразках *Nicotiana tabacum*, активність фермента у мкМ вуглеводів / (мкг білка\*сек).

	1 хвилина опромінення	5 хвилин опромінення	10 хвилин опромінення
<i>Nicotiana tabacum</i> , природний	1,83428	2,53601	2,19
<i>N.t gfp:licBM3</i> , трансгенний контроль	3,17479	2,6928	3,05391
<i>N.t. DesA+DesC</i> , досліджуваний організм	3,20106	3,10063	3,20106

У даному експерименті, кількісна ліхеназна реакція використовується у якості маркеру експресії цільових генів, так як ген ферменту ліхенази знаходиться в одній рамці зчитування з генами *desC* та *desA*.



#### 2.4.4. Аналіз пошкодження клітинної мембрани та вихід електролітів

Для імітації надмірного опромінення УФ у географічних зонах з виснаженим озоновим шаром, використовували люмінесцентну лампу OSRAM T5/G5 потужністю 30 Вт, за 1 хвилину опромінювання: 261,6 Дж/м<sup>2</sup>. Заміри проводили на зразках, що знаходились під дією UV протягом 1 хвилини, 5 хвилин, та 10 хвилин.

Ступінь втрати електролітів клітиною внаслідок руйнування структури мембрани під впливом надмірного UV можливо визначити за допомогою аналізу рівня виходу електролітів у деонізат, в середовище з якого поміщали досліджувані зразки тканин *Nicotiana tabacum*. Результати представлені на рисунку 2.6. та таблиці 2.2.

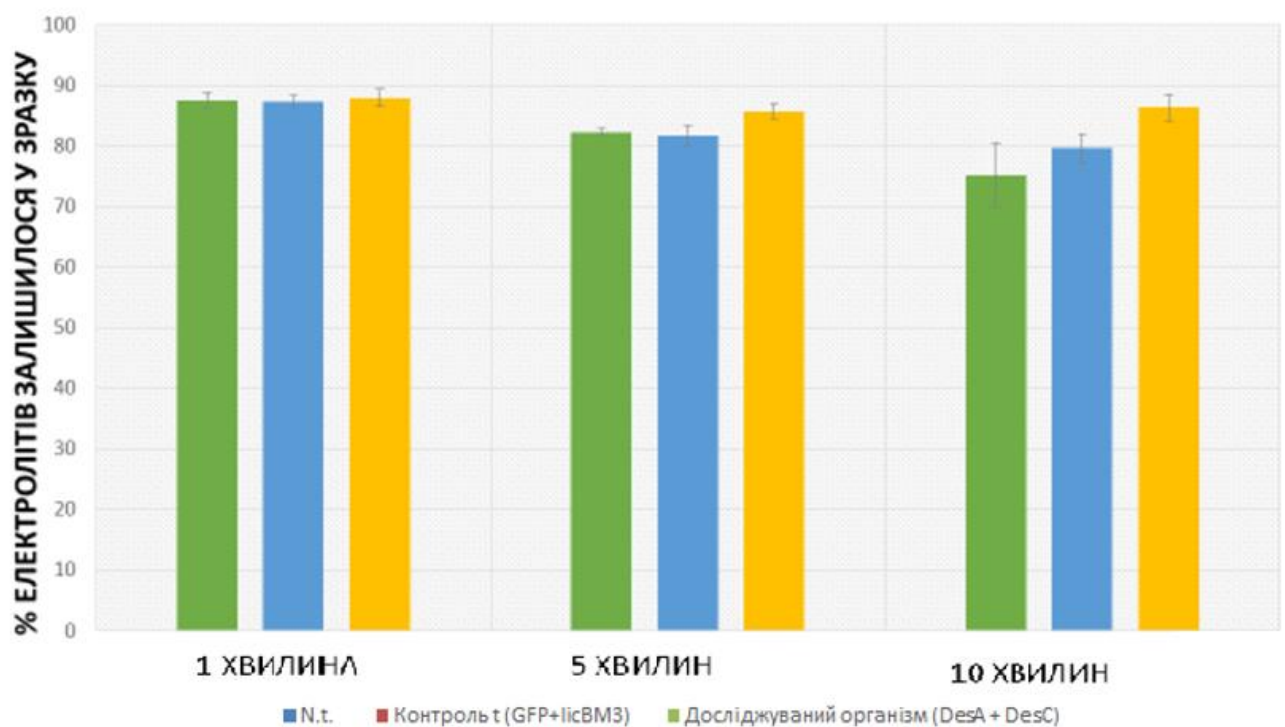


Рисунок 2.6 — Вихід електролітів зі зразків *Nicotiana tabacum*

Таблиця 2.2. Вихід електролітів зі зразків *Nicotiana tabacum*

	1 хвилина опромінення	5 хвилин опромінення	10 хвилин опромінення
<i>Nicotiana tabacum</i> , природний	87,57766	82,26472	75,24106
<i>N.t gfp:licBM3</i> , трансгенний контроль	87,2998	81,78131	79,63878
<i>N.t. DesA+DesC</i> , досліджуваний організм	87,9389	81,78131	86,34208

Показники рівня виходу електролітів вказують на більшу ступінь пошкодження клітинних мембран у зразках контрольних організмів. Рослини, що несуть гени *DesA+DesC* та експресують гени ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій, демонструють менший рівень виходу електролітів після опромінення надмірним УФ, що свідчить про підвищення стійкості мембран до даного типу впливу.

#### 2.4.5. Аналіз активності супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза каталізує дисмутацію кисневих радикалів у кисень і перекис водню. Таким чином, вона грає найважливішу роль в антиоксидантному захисті більшості типів клітин. СОД активується при впливі стресових факторів та є стандартним механізмом реакції рослини на вивільнення продуктів реакцій окиснення, в які вступають вивільнені радикали при пошкодженні організму від реакцій окисного типу [74].

Аналізували показники активності ферменту супероксиддисмутаза за методикою з використанням фотохімічного окислення нітросинього

театразолію. Активність СОД виражали в одиницях активності на міліграм білка. Результати представлені на рисунку 2.7. та таблиці 2.3.

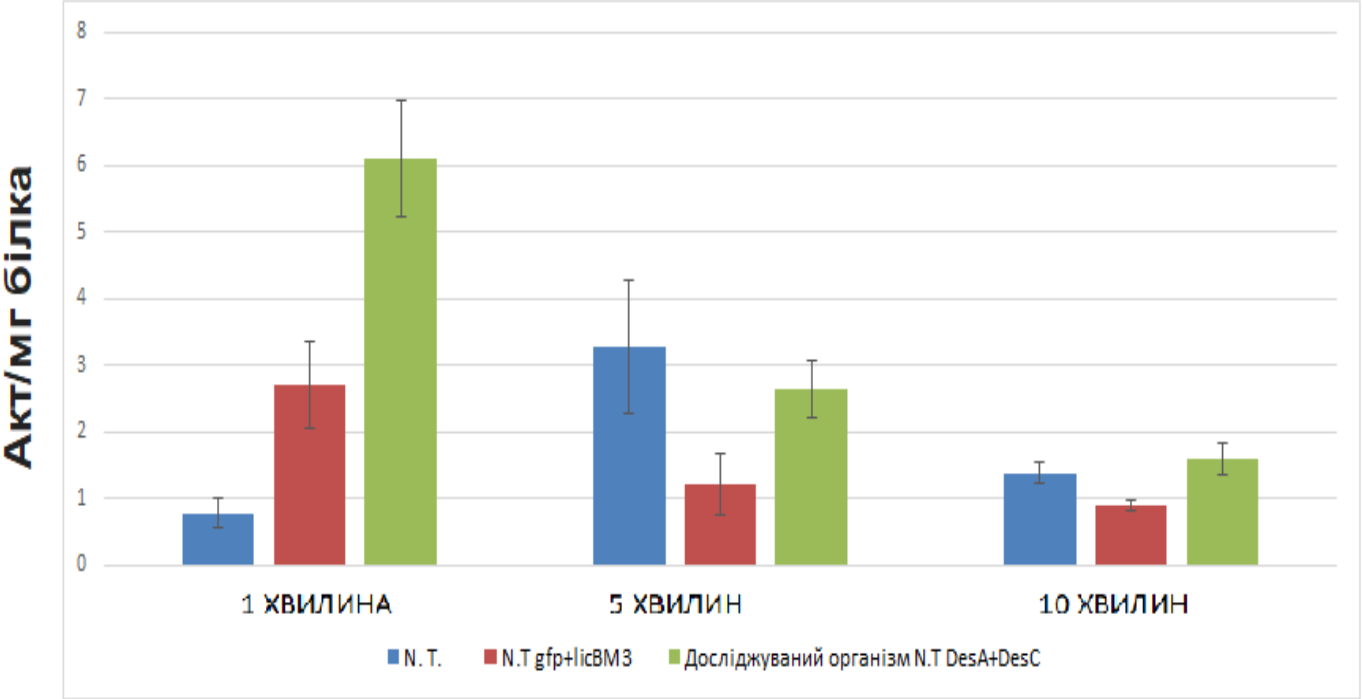


Рисунок 2.6 — Активність СОД у досліджуваних зразках *Nicotiana tabacum* в залежності від часу опромінення УФ

Таблиця 2.3. Активність СОД у досліджуваних зразках *Nicotiana tabacum* в залежності від часу опромінення УФ

	1 хвилини опромінення	5 хвилин опромінення	10 хвилин опромінення
<i>Nicotiana tabacum</i> , Природний	0,783134	3,277048	1,389027
<i>N.t gfp:licBM3</i> , трансгенний контроль	2,719446	1,208561	0,896477
<i>N.T. DesA+DesC</i> , досліджуваний організм	6,093951	2,642841	1,593693

По результатам експериментальних даних, було встановлено збільшення рівня активності супероксидисмутази у досліджуваних зразках трансгенного *Nicotiana tabacum*, що експресує гени DesA та DesC. З цього можливо зробити висновок, що цільовий організм має вищу пристосованість до пошкоджень, викликаних окисною деструкцією.

#### 2.4.6. Аналіз спектру жирних кислот методом газової хроматографії та мас-спектрометрії

Подальша робота передбачала дослідження спектру ЖК мембранних ліпідів трансгенних ліній та контрольних зразків. Всі рослини використані у дослідженнях були проаналізовані методом газової хроматографії та мас-спектрометрії разом з к.б.н. завідуючим центром колективного користування Остапчуком А. М. та к.б.н., н.с. Хархотою М.О. Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного.

Аналіз спектра ЖК здійснювали методом газової хроматографії та мас-спектрометрії. Результати представлені на таблиці 2.4 та на рисунку 2.7. та 2.8.

Таблиця 2.4. Аналіз спектру жирних кислот зразків досліджуваних рослин *Nicotiana tabacum*

Рослина	C16:0	C16:1	C18:0	C18:2	C18:3
Контроль <i>N. tabacum</i>	21,1±0,8	1,6±0,8	1,1± 0,5	18,5±5,3	57,5±5,7
Контроль <i>N. tabacum (gfp:licBM3)</i>	20,9±2,6	1,9±1,8	1,8±0,3	17,5±4,7	57,9±3,2
<i>N. tabacum</i> ( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №5	13,2±1,9	1,4±0,05	2,3±0,07	24,3±0,05	61,5±0,7
<i>N. tabacum</i> ( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №6	11,7±1,8	0,9±0,03	1,9±0,08	23±0,9	63,6±1,3
<i>N. tabacum</i> ( <i>desA+desC:licBM3</i> ) №15	12,3±0,8	1,5±0,04	1,8±0,03	22±0,8	65,8±1,3

- C16:0 пальмітинова кислота
- C16:1 стеаринова кислота
- C18:0 олеїнова кислота
- C18:2 лінолева кислота

- C18:3 ліноленова кислота

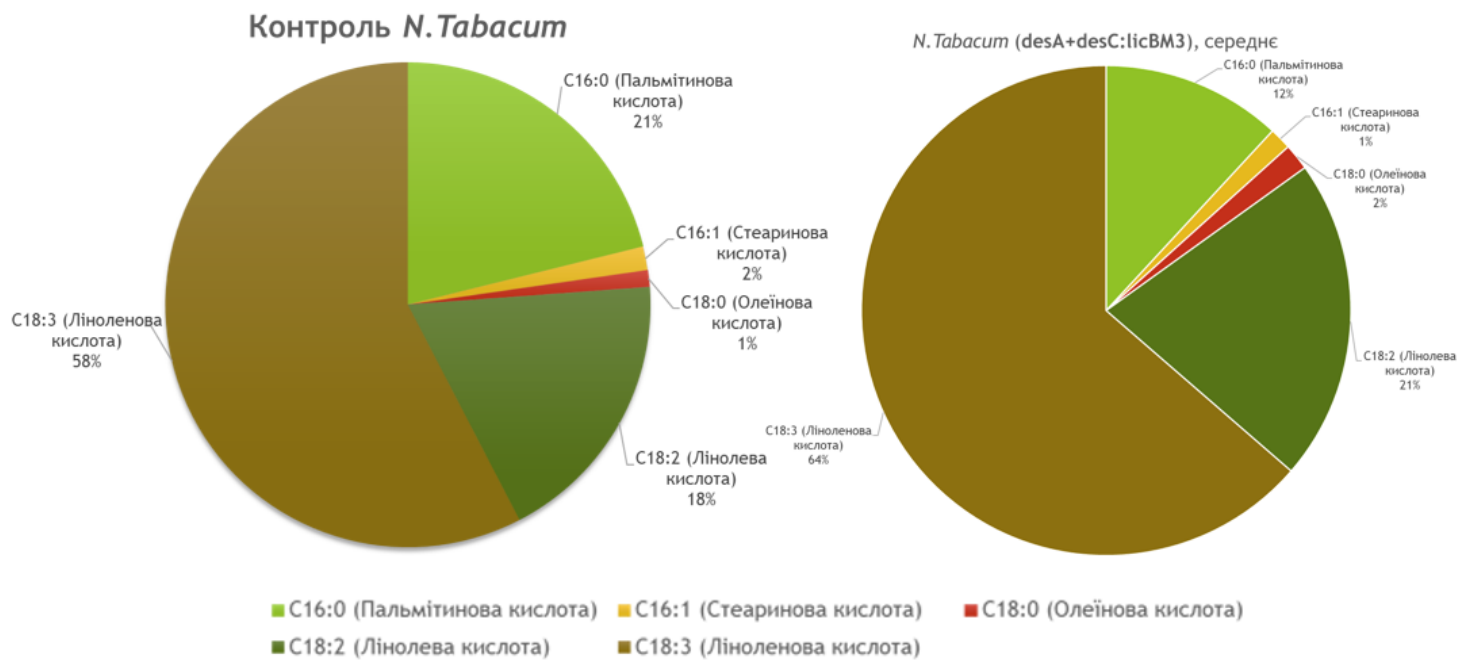


Рисунок 2.7 — Порівняльні діаграми вмісту ЖК у контрольної рослини *N.T* «дикого типу» та усереднених значень досліджуваних зразків трансгенного організму

За результатами аналізу спектру ЖК встановлено, що вміст ненасичених ЖК внаслідок експресії генів DesA та DesC (лінолевої, ліноленової кислот) у зразках трансгенного *N. tabacum* із врахуванням похибки вищий на 3% та 7% відповідно, порівняно з контрольними зразками.

Саме накопичення ненасиченої ліноленової у клітинних мембранах рослин пов'язують з підвищенням стійкості до температурного стресу [75]

## Висновки до розділу 2

Отже, *in vitro* на зразках отриманої сталої трансгенної рослини *Nicotiana tabacum* з експресією генів DesA та DesC ціанобактерій, було проведено ряд дослідів для підтвердження зміни адаптивної здатності організму до УВ внаслідок зміни спектру ЖК у складі клітинних мембран.

Отримані результати аналізів щодо рівня втрати електролітів досліджуваних зразків та активність в них ферменту супероксиддисмутази, свідчать про більшу адаптивну здатність трансгенного організму *Nicotiana tabacum* у порівнянні з контрольними зразками (*N.T* «дикого типу» та *N.T* із репортерним геном термостабільної ліхенази). Дослідження спектру ЖК у складі мембранних ліпідів зразків, виявило більший рівень накопичення ненасиченої ліноленової кислоти у рослині *Nicotiana tabacum* з генами DesA та DesC. Це дає змогу зробити висновок щодо впливу експресії генів десатураз ЖК ціанобактерій на збільшення пристосованості організму до надмірного впливу ультрафіолетового випромінювання.

### 3 СТАРТАП ПРОЕКТ

#### 3.1 Резюме: конкретизація бізнес-ідеї, мети стартапу, об'єкту дослідження, місця розробки у інноваційному ланцюжку цінностей

Загальна характеристика розробки: створення лінії трансгенної рослини *Nicotiana Tabacum*, що експресує гени ферментів ціанобактерій, які позитивно впливають на її адаптивну здатність до абіотичних стресів (холод, засуха, надмірне УФ-випромінення).

Бізнес ідея: вирощування рослинної сировини для виробництва біопалива.

Об'єкт дослідження: Тютюн звичайний (*Nicotiana Tabacum*)

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: проект знаходиться на фінальній стадії, стала лінія трансгенних рослин отримана, вплив експресії цільових генів на адаптивну здатність доведена

Продукт наукової розробки: трансгенний організм *Nicotiana Tabacum* з активними генами *desA* та *desC*, які впливають на десатурацію жирних кислот у складі мембранних ліпідів

Технологія: агробактеріально-опосередкована трансформація

Доступність сировинної бази: сировина у вигляді насіння або експлантів цільової рослини доступна на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікація персоналу: у технологічному процесі задіяні типовий персонал агропромислового комплексу (механізатори, агрономи, менеджерський персонал)

Ринок збуту: держави з урегульованою політикою стосовно вирощування та промислового застосування ГМО (США, Бразилія, Аргентина, Індія, Канада, Китай, Парагвай, загалом понад 40 країн)

Цінність: альтернативний відновлювальний вид сировини для виготовлення біопалива, що здатний вирощуватись у недоступних географічних зонах для не-трансгенної аналогічної рослини

Модель підприємництва: B2B

Розширені характеристики подано в таблиці 3.1

Таблиця 3.1. Характеристики підприємства.

Сутність ідеї	Вирощування рослинної сировини для виробництва біопалива.
Продукт	Трансгенний організм <i>Nicotiana Tabacum</i> з активними генами desA та desC
Наявність аналогів або прототипів	Нетрансгенний <i>Nicotiana Tabacum</i>
Основна потреба, яку задовільнить реалізований стартап	Відновлювальне джерело сировини для енергоносія
Суб'єкт замовлення	ДТЕК (DTEK)
Об'єкт дослідження	Тютюн звичайний ( <i>Nicotiana Tabacum</i> )
Мета наукової розробки	Створення лінії трансгенної рослини <i>Nicotiana Tabacum</i> , що буде придатною для вирощування у досі непридатних географічних зонах
Ступінь розробленості технології реалізації	Продукт готовий до висівання та вирощування
Наявність готового технологічного обладнання	Надається суб'єктом замовлення
Готовність бази постачальників для реалізації замовлень стартапу	В процесі фіналізації
КВЕД	72.11 (дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій) 01.15 (вирощування тютюну)
Очікувана потужність стартапу	Мале підприємство (на старті)
За масштабом виробництва	Серійне
За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке
За чисельністю персоналу	Середнє
За рівнем технологічної цілісності	Дочірнє утворення
За організацією виробничих процесів	Періодичне
Органи управління	Національні



Продовження Таблиця 3.1

Географічне розташування а) потужностей	Бразилія, Аргентина, Індія і т.д.
б) офісу	М. Київ, вул. Льва Товстого 57, бізнес-центр 101 Tower
в) збутової мережі	Виробники біопалива по всьому світу
г) постачальників комплектуючих	Найближчі до агропромислових комплексів
Місце ідеї у ланцюжку цінностей	Розробка
Бізнес-модель стартапу	B2B
Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Відсутні
Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Відсутні
Ключові фактори успіху стартапу	Висока адаптивна здатність рослини у порівнянні з аналогами, продуктивність, відновлюваність.
Споживачі на етапі розвитку	Енергетичні підприємства, виробники біопалива
Споживачі на етапі зрілості	Енергетичні підприємства, виробники біопалива
Конкурентна ціна на продукт стартапу	10 850 грн
Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	30.9%
Капіталовкладення у проект	6 577 140 грн
Період повернення капіталовкладень у проект	10 років
Джерела фінансування	Національні, зовнішні, внутрішні

Продовження Таблиця 3.1

Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Трансгенна рослина <i>Nicotiana Tabacum</i> з генами desA та desC
Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	На початковій стадії проекту (перший рік), реалізація продукції відбувається через мережу збуту суб'єкта замовлення. В якості посередника виступає його дочірня компанія — Д.ТРЕЙДІНГ.

### 3.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху

Таблиця 3.2 – Загрози і можливості зовнішнього середовища

Загрози	Можливості
<b>Фактор – Політика</b>	
Погіршення політичної ситуації та, відповідно, відносин із державами, на території яких буде вирощуватись культура трансгенного тютюну	Приваблення закордонних інвесторів та розширення ринку збуту
Зміни у податковій системі і законодавстві стосовно використання ГМО	Легалізація промислового використання ГМО на території України, що дасть змогу вирощувати культуру на території країни
<b>Фактор – Економіка</b>	
Збільшення цін на оренду земельних площ, зменшення попиту на біопаливо	Збільшення цін на традиційні паливні енергоносії
Криза економіки через епідеміологічну ситуацію	Інтенсивний розвиток економіки у післякризовий період

Продовження Таблиця 3.2

<b>Фактор - Географія</b>	
Сировина доступна, а модифікація незапатентована, що може стати причиною появи конкурентів	Зміна клімату та виснаження озонового шару призведе до стрімкого підвищення попиту на продукт
<b>Фактор – Демографія</b>	
Скептичне ставлення народних мас до ГМО	Підвищення числа споживачів
<b>Фактор – Науково-технічний прогрес</b>	
Вірогідність появи нових, більш продуктивних та витривалих до умов оточуючої середовища джерел сировини для біопалива	Можливість механізації і автоматизації більшості технологічних процесів. Можливе знаходження нових потенційних генів, що можуть підвищити продуктивність та адаптивність джерела сировини

Зовнішнє оперативне середовище містить наступні фактори: постачальників, посередників, споживачів. Його переваги та недоліки наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Переваги і недоліки зовнішнього оперативного середовища

<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
<b>Фактори – Постачальник, Виробник</b>	
Впевненість у якості сировини.	Обов'язкова сертифікація сировини.
Виробництво вимагає стандартне неспецифічне сільськогосподарське обладнання, що доступне у будь-якій країні та легко піддається заміні.	Виробництво вимагає вкладень у вигляді обладнання та орендної плати за земельну площу для вирощування.
<b>Фактор - Споживач</b>	
Оптимальна сировина для виготовлення біопалива.	Наявність альтернативних видів сировини.

Продовження Таблиця 3.3

<b>Фактор - Посередники</b>	
Основні функції посередника та логістичні функції бере на себе суб'єкт замовлення, холдинг DTEK	Збільшення вартості готової продукції.
<b>Фактор - Конкуренти</b>	
У даній специфічній ніші продукт має перевагу над альтернативами сировини внаслідок розширеного географічно-кліматичного ареалу для вирощування, підвищеної витривалості та продуктивності.	Потенційні: агрохолдинги та тютюнові компанії, що можуть зацікавитись даним видом використання тютюну та його модифікаціями.

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ було сформовано перелік зацікавлених сторін (Таблиця 3.4)

Таблиця 3.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив на реалізацію проекту	Цікавість до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
Конкурент	В разі недобросовісності, може впливати негативно шляхом демпінгування цін на власну сировину	Зацікавлений у тому, щоб проект не був реалізований чи не окупився	0,1
Посередник	Керує логістичними процесами та забезпечує площі для вирощування сировини, відповідає за збут продукції.	Зацікавлений у тривалій співпраці на взаємовигідних умовах, тобто у розвитку виробництва	0,5

Продовження Таблиця 3.4

Споживачі	Формують попит, що впливає на обсяги виробництва та продажу	Зацікавлені у покупці ефективного товару за оптимальною ціною	0,2
Суб'єкти зовнішнього середовища			
Суб'єкти економічного середовища	Впливають на обсяги продажів через зміну економічних показників (інвестування коштів, курси валют, умови кредитування тощо)	Розвиток відновлювальної енергетики – перспективна сфера, так як є пунктом у стратегіях розвитку більшості країн.	0,1
Суб'єкти географії	Впливають на експансію агропромислового комплексу	Зацікавленості немає	0,05
Суб'єкти демографії	Зниження кількості населення (низька народжуваність, еміграція тощо) зменшує кількість потенційних споживачів та робітників	Зацікавлені у зростанні економіки внаслідок появи альтернативних джерел палива, дешевших за імпорт традиційних вуглеводних	0,1

Продовження Таблиця 3.5

Суб'єкти культурного середовища	Новини про продукт стартапу можуть нести позитивний чи негативний відтінок, а, відповідно, чинити позитивний чи негативний вплив на обсяги реалізації	Зацікавлені в появі нових технологій та продуктів	0,1
Суб'єкти НТП	Підвищення якості освіти та розробка нових технологій приведе до появи конкуруючих джерел енергоносіїв	Незацікавлені у використанні земельних ресурсів у якості сировинної бази закордонними компаніями	0,1

Також було проведено аналіз внутрішнього середовища, що забезпечує визначення сильних та слабких сторін в процесі реалізації стартап-проекту (Таблиця 3.5).

Таблиця 3.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Складові внутрішнього середовища	Переваги	Недоліки
Реклама	В2В-продажі, участь у заходах присвячених енергетиці (форуми, симпозиуми), просування продукції через існуючих партнерів ДТЕК	Високий вплив репутації та бізнес-процесів суб'єкта замовлення ДТЕК на ефективність реалізації проекту

Продовження Таблиця 3.5

Фінанси	ДТЕК виступає в ролі основного інвестора	Залежність від зовнішніх інвестицій
Виробництво	Не потребує високотехнологічного обладнання	Залежить від кліматичних факторів
Персонал	Більшість співробітників не потребують специфічної освіти або високої кваліфікації, а відповідно – високих зарплат.	Іноземний ринок праці
Організація управління	Залучення до роботи підприємства спеціалістів з бізнес планування та маркетингологів.	Невелика чисельність адміністративного персоналу на етапі розвитку.

### 3.3. Визначення ключових факторів успіху проекту

Для більш наглядної оцінки технічного рівня продукту проектуванні і аналогів, а також для більшої об'єктивності оцінки порівнюємо дані готового товару методом Шонфільда (Таблиця 3.6).

Таблиця 3.6 – Визначення ключових факторів успіху проекту методом Шонфільда

№	Характеристики	Вагомість хар-ки	Кукурудза	Ріпак	Тютюн, предмет стартапу
1	Енергетична цінність	0,3	3	5	4
2	Вихід біомаси з 1 га, засіяного культурою	0,3	3	3	4
3	Ціна за тону	0,2	3	4	4

Продовження Таблиця 3.6

4	Діапазон придатних для вирощування кліматичних/географічних зон	0,2	3	4	5
---	---	-----	---	---	---

Таблиця 3.7 – Бальна оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
	Кукурудза	Ріпак	Тютюн
Енергетична цінність	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	$0,3 \cdot 5 = 1,5$	$0,3 \cdot 4 = 1,2$
Вихід біомаси з 1 га, засіяного культурою	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	$0,3 \cdot 4 = 1,2$
Ціна	$0,2 \cdot 3 = 0,6$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$
Діапазон придатних для вирощування кліматичних/географічних зон	$0,2 \cdot 3 = 0,6$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	$0,2 \cdot 5 = 1$

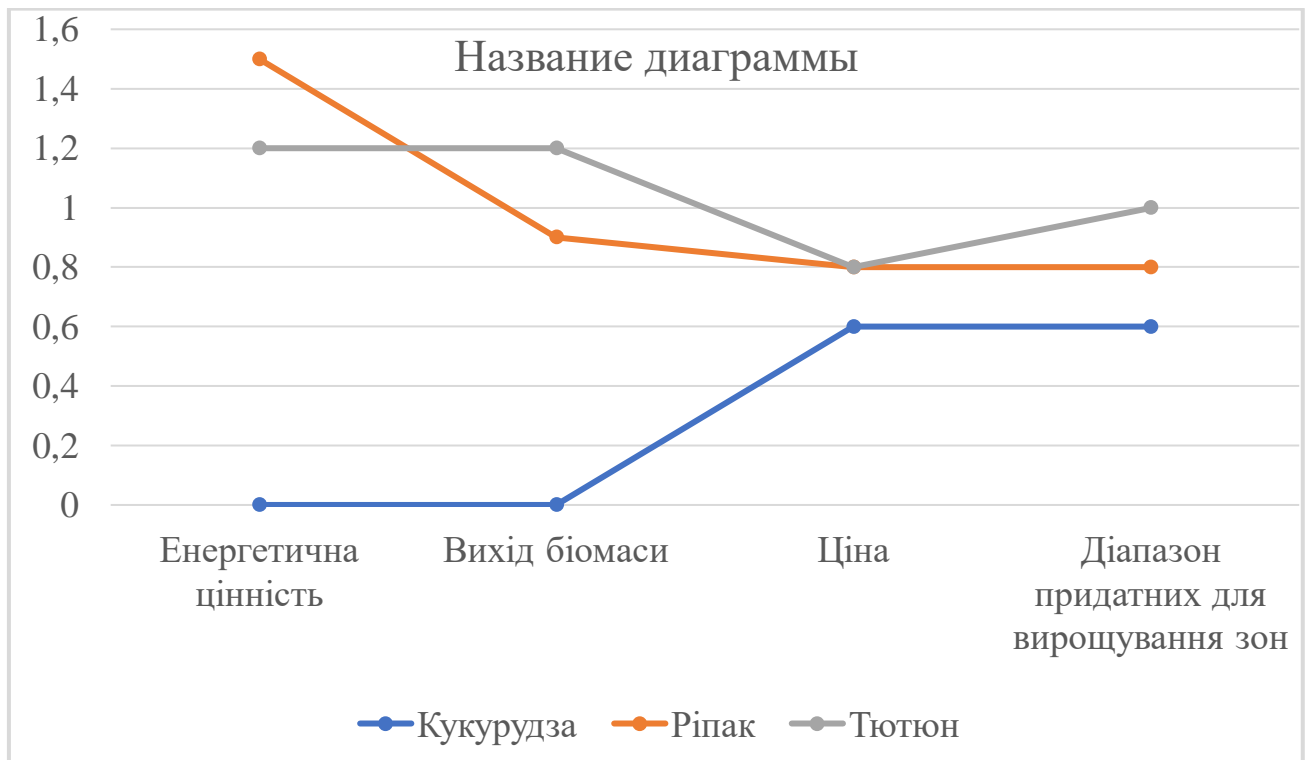


Рис. 3.1 Аналіз ключових факторів успіху проекту



У результаті виконання аналізу факторів успіху, трансгенний тютюн підтвердив свою переваги над основними альтернативами. Основною його перевагою є підвищена адаптивна здатність до абіотичних стресових факторів, що надає змогу вирощувати його в непридатних для аналогів кліматичних зонах. Аналіз усіх факторів показує, що продукт є цінним та вартим того, щоб вводити його на ринок.

На основі аналізу ключових факторів успіху стартап-проекту визначалися можливі варіанти розвитку інноваційної ідеї (Таблиця 3.9).

Таблиця 3.9 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Продаж технології на етапі розробки іншим енергетичним компаніям або агрохолдингам	Продаж технології за максимальну ціну, отримання разового прибутку або дивідендів
Отримання інвестицій та організація дочірнього підприємства енергетичного/агро холдингу	Створення випробувальних АПК на території інших країн, оцінка рентабельності проекту через 3-4 цикли збору біомаси ( $\approx 1$ рік) та її подальшої переробки у біопаливо.
Подальші дослідження по переносу даної генетичної конструкції у інші види рослин	Створення ліній нових видів рослин, більш витривалих до абіотичних стресових факторів та їх подальша комерціалізація

### 3.3. Визначення потенційних споживачів

Огляд основних груп потенційних споживачів та їх потреб наведено у Таблиця 3.10.

Таблиця 3.10 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Суб'єкт замовлення	Вихід на світовий ринок біопалива
Енергетичні компанії	Альтернативний вид сировини для біопалива, придатний до вирощування у нових зонах

Таблиця 3.11 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Енергетичні компанії	
1. Форма власності	Державні та приватні
2. КВЕД	20.59 : Виробництво іншої хімічної продукції, н.в.і.у.
3. За потужністю	середні, великі
4. За масштабом виробництва	серійні, масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються	Працемісткі, матеріаломісткі
7. За чисельністю персоналу	середні, великі
8. За сферою діяльності	Оптова торгівля
9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, іноземні
9. За приналежністю капіталу і контролю	національні, іноземні, спільні багатонаціональні
10. За географічним розташуванням	Україна, інші країни
11. За віддаленістю органів управління	Національні, іноземні, транснаціональні

Продовження Таблиця 3.11

12. За характером господарської діяльності	Енергетичні
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні, дочірні, філії
14. За долею іноземного капіталу	Без іноземних інвестицій, з іноземними інвестиціями, іноземні
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	періодичні, безперервні
17. За роботою протягом року	Сезонні, позасезонні

Основними клієнтом на старті виробництва виступає суб'єкт замовлення, а в подальшому при підтвердженні рентабельності розробки – інші енергетичні компанії-виробники біопалива.

Проведено планування обсягу реалізації продукції у початковому періоді – на перший рік виробництва (Таблиця 3.12). Враховано цикл зростання тютюну, який займає 14-16 тижнів (1 квартал, 3.75 місяців). У початковій, випробувальній стадії реалізації планується висадити 3 поля по 10 гектарів кожне у різних кліматичних зонах. Середня врожайність: 2 т/га за 1 цикл.

Таблиця 3.12– Обсяг реалізації, запланований для стартап-продукту на перший рік виробництва

Період	Запланований обсяг, т.
Січень 2021	60
Лютий 2021	
Березень 2021	
Квітень 2021	

Продовження Таблиця 3.12

Травень 2021	70
Червень 2021	
Липень 2021	
Серпень 2021	
Вересень 2021	80
Жовтень 2021	
Листопад 2021	
Грудень 2021	
Всього:	210 т

### 3.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки

#### 3.5.1 Джерела фінансування

Основними джерелами фінансування є кошти компанії-суб'єкта замовлення.

#### 3.3.2 Розрахунок ціни інноваційної пропозиції

Проведено розрахунки ціни інноваційної пропозиції на ринку за різними методами. Для розрахунку розміру амортизаційних відрахувань необхідно розрахувати розмір основних фондів стартапу, що наведені у таблиці 3.14.

Земельні ділянки для вирощування продукції в таблиці не представлені, так як надаються в експлуатацію компанією-суб'єктом замовлення.

Таблиця 3.14 – Вартість основних фондів старту

Одиниця	Кількість, шт	Вартість одиниці, грн	Вартість за кількість обладнан ня, грн
Комбайн для збору врожаю	3	967 000	2 901 000
Самоходний обприскувач	3	540 000	1 620 000
Вантажний транспорт	3	300 000	900 000
Господарські споруди	3	50 000	150 000
С/г інвентар	15	3000	45 000
<b>Загальна вартість</b>			<b>5 616 000 грн</b>

Амортизація техніки, інвентарю, споруд – термін експлуатації 5 років:

$$A = OЗ / T_{\text{експл}} = 5\,616\,000 / 5 = 1\,123\,200 \text{ грн/рік.}$$

В таблиці 3.15 наведені заробітні плати працівників для розрахунку фонду оплати праці.

Таблиця 3.15– Заробітні плати працівників

Посада	Кількість працівників	Заробітна плата на одного працівника грн/міс	ЗП, грн/рік
Директор-розробник	1	28 000	336 000
Агроном-технолог	2	18 000	432 000
Механізатор	3	12 000	432 000
Технічний персонал	6	8000	576 000
Всього			1 776 000

Таблиця 3.16 – Вартість оборотних засобів

Оборотні засоби	Ціна, грн/од	Кількість, шт	Загальна вартість, грн/рік
Добрива	500	108	54 000
Пальне для транспорту	25	12000	300 000
Електроенергія	1,68 грн/кВт*год	250 кВт*год/міс	5 040
Водопостачання	21,756 за 1м <sup>3</sup>	2000 м <sup>3</sup> /міс	522100
Трансфер			30 000
Адміністративні витрати			50 000
Оборотні засоби			961 140

Отже собівартість проекту складає:

$$C = A + \text{ОбЗ} = 1\,123\,200 + 961\,140 = 2\,084\,340 \text{ грн/рік.}$$

Плановий вихід продукту: 210 т/рік

Собівартість одиниці: 9 925,4 грн

1. Витратний метод.

$$\text{Ц} = C + \%П = 9\,925,4 \text{ грн} + 2\% = 10\,123,9 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку, %П = 1-3%.

2. Параметричний метод.

$$\text{Ц}_н = \frac{Б_n}{Б_б} \cdot \text{Ц}_б = \frac{4.5}{4} \cdot 14150 = 15\,918,75 \text{ грн}$$

Де Ц<sub>н</sub> – ціна нового продукту, грн., Ц<sub>б</sub> – ціна базового продукту (був ріпак), грн., Б<sub>б</sub> – бали за властивості базового продукту, Б<sub>н</sub> – бали за властивості нового продукту

3. Метод точки беззбитковості.

$$\text{Ц} = C = 10\,123,9 / 9\,925,4 = 1.02 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн.

4. Метод конкурентних цін.

$$\text{Ц} = \frac{\text{Ц}_{x1} + \text{Ц}_{x2} + \text{Ц}_{x3}}{N} = \frac{14150 + 7550 \text{ грн}}{2} = 10\,850 \text{ грн.}$$

Де  $C$  – ціна одиниці товару, грн.,  $C_{x1,x2}$  – ціни конкурентів, грн.,  $N$  – кількість використаних цін конкурентів.

Для ціноутворення були проаналізовані різні методи, а також вибрана ціна продукту у 13 000 грн.

### 3.3.3 Техніко-економічні показники стартап-проекту

1. Річний обсяг реалізації ідеї:

$$B = 210 \text{ тон}$$

2. Капіталовкладення у проект:

$$K = OF + OBZ = 5\,616\,000 + 961\,140 = 6\,577\,140 \text{ грн};$$

на одиницю продукції:

$$K = 6\,577\,140 / 210 = 31\,319,71 \text{ грн/т.}$$

3. Повна собівартість:

$$C = A + OBZ = 1\,123\,200 + 961\,140 = 2\,084\,340 \text{ грн};$$

на одиницю продукції:

$$C = 2\,084\,340 / 210 = 9\,925,4 \text{ грн/т.}$$

4. Відносний прибуток:

$$\Pi = 13\,000 - 9\,925,4 = 3\,074,6 \text{ грн/т.}$$

5. Рентабельність:

$$P = (\Pi / C) \times 100\% = (3\,074,6 / 9\,925,4) \times 100\% = 30,9\%.$$

5. Період повернення капіталовкладень:

$$T_{\text{пов}} = K / \Pi = 31\,319,71 / 3\,074,6 \sim 10 \text{ років}$$

6. Фондовіддача виробничих фондів:

$$FB = (C \times B) / OF = (13\,000 \times 210) / 5\,616\,000 = 4.86 \text{ грн}$$

7. Фондоємність:

$$FC = 1 / FB = 1 / 4.86 = 0,2 \text{ грн/грн.}$$

8. Коефіцієнт економічної ефективності:

$$E = \Pi / K = 3\,074,6 / 31\,319,71 = 0,09\%$$

Усі техніко-економічні показники зібрано до таблиці 3.17.

Таблиця 3.17 – Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Значення
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	тони	210
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	осіб	12
3. у тому числі - основних - інженерно-технічного персоналу	осіб	5
4. Середньорічний виробіток робітника	т/особу	17.5
5. Капіталовкладення у проект: - всього - на одиницю продукції	грн. грн/т	6 577 140 31 319,71
6. Повна собівартість - всього - на одиницю продукції	грн. грн/од	2 084 340 98,25
7. Відносний прибуток - всього - на одиницю продукції	грн. грн/од	618 600 9 925,4
8. Рентабельність	%	30.9%
9. Період повернення капіталовкладень	років	10
10. Фондовіддача виробничих фондів	грн/грн	4.86
11. Фондоємкість	грн/грн	0,2
12. Продуктивність праці	грн/особу	745
13. Коефіцієнт економічної ефективності		0,09%

### 3.3.4 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів

Розробниками була обрана концепція B2B або Business to business, що найбільше відповідає діяльності стартапу та передбачає співпрацю з іншими компаніями через компанію-посередника.



Також було побудовано карту бізнес-процесів стартапу, де визначено основні характеристики процесів поетапно (Таблиця 3.18).

Таблиця 3.18 – Карта бізнес-процесів

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Приблизна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	2 особи	10 год	80 грн
	Пошук наукових статей	2 особи	10 год	80 грн
	Зустріч зі спеціалістом	3 особи	2 год	16 грн
	Створення команди	3 особи	4 год	320 грн
	Домовленості з суб'єктом замовлення	3 особи	7 год	25 000 грн
	Вибір локації тестових полів	3 особи	50 годин	3000 грн
Реалізація ідеї	Підготовка полів та персоналу	2 особи	15 днів	4000 грн
	Вирощування та збір врожаю	11 осіб, спецтехніка	3,7 місяці/цикл	16000 грн

	Контроль якості	2 особи. Лабораторія-підрядник	12 год/рік	6000 грн
Реалізація	Встановлення контактів зі споживачами через посередників	1 особа	24 год	10 000 грн

Продовження Таблиця 3.18

Продаж проекту	Договори із покупцями	2 особи	10 год	-
	Проведення тендеру	2 особи	8 год	-
	Вибір місця проведення торгів	1 особа	2 год	-
	Формування договору продажу та остаточний продаж стартапу	2-4 особи	5 год	-

На основі карти бізнес-процесів виконання стартап-проекту, було проведено розподіл функцій між відповідальними за їх реалізацію працівниками та визначено кадрові потреби стартап-проекту на кожному із етапів (Таблиця 3.19).

Таблиця 3.19 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Розробник	Агроном-технолог	Механізатор	Технічний працівник
Генерування ідеї	+			
Формування команди та домовленостей	+			
Огляд літератури	+			
Пошук і доставка сировини	+		+	
Проведення досліджень	+			
Домовленості з суб'єктом замовлення	+			
Вибір локації тестових полів	+	+		
Підготовка полів та персоналу	+	+		+
Вирощування та збір врожаю		+	+	+

Продовження Таблиця 3.19

Контроль якості		+	+	+
Перепідготовка кадрів	+	+		+
Формування договорів	+			
Договори із покупцями	+			
Проведення тендеру	+			
Вибір місця проведення торгів	+			
Продаж проекту	+			

### 3.6 Оцінка ризиків та страхування розробки

Сформовано перелік ризиків, що можуть загрожувати підприємству. Для кожного з ризиків оцінювалася імовірність настання та вплив на очікуваний результат. Результати системного аналізу ризиків бізнес-процесу наведено у Таблиця 3.20

Таблиця 3.20 – Оцінка ризиків

Бізнес-процес	Ризик	Ймовірність настання ризику	Вплив ризику на дохід
Генерування ідеї	Втома автора	Низька	Середній
Формування команди	Некомпетентність членів команди	Низька	Високий
Огляд літератури	Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Низька	Низький
Пошук і доставка сировини	Використання непідходящої сировини	Низька	Високий
Проведення досліджень	Похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	Низька	Високий

Продовження Таблиця 3.20

Домовленості з суб'єктом замовлення	Дискомунікація, конфлікт інтересів	Середня	Високий
Вибір локації тестових полей	Невдале місце вирощування	Середня	Високий
Підготовка полей та персоналу	Неякісна підготовка	Низька	Середній
Вирощування та збір врожаю	Псування врожаю	Середня	Середній
Контроль якості	Недотримана технологічна наповненість інструкції	Низька	Середній
Перепідготовка кадрів	Некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки	Низька	Середній
Формування договорів	Невдало вибрані методи контролю	Середня	Середній
Договори із покупцями	Недієва реклама	Середня	Середній
Проведення тендеру	Занадто низька/висока ціна проекту. Проект не окупиться.	Середня	Середній

Результати оцінювання всіх ризиків за критеріями настання та впливом на очікуваний результат наведено у матриці оцінки ризиків (Таблиця 3.21).

Таблиця 3.21 – Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат	За ймовірністю настання ризиків			
	Критерій ризику	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
	Числове значення	1	2	3
Високий рівень впливу	3	- Використання непідходящої сировини, - некомпетентність членів команди, - похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	- Вибір невідповідної локації - Неправильно вибране обладнання, невдала технологія -пожежа	
Середній рівень впливу	2	- Втома автора, - погодні умови - недотримана технологічна наповненість інструкції, - некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки,	- невдало вибрані методи контролю - занадто низька/висока ціна проекту	
Низький рівень впливу	1	- Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою		

Для усіх визначених ризиків розроблено план з управління ними (Таблиця 3.22).

Таблиця 3.22 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Втома автора	Попередження ризику	Директор	Стадія генерування ідеї	Подовження тривалості реалізації стартапу
Некомпетентність членів команди	Попередження ризику	Директор	Стадія створення команди	Ретельний підбір кваліфікованих людей
Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Попередження ризику	Директор	Стадія генерування ідеї	Виділити більшу кількість часу
Використання непідходящої сировини	Передача ризику	Директор, лаборант	Стадія досліджень	Детальне обговорення із технологом
Похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	Попередження ризику	Лаборант, технолог	Стадія впровадження у виробництво	Ретельне проведення досліджень із перевіркою на різному обладнанні

Продовження Таблиця 3.22

Вибір невідповідної локації вирощування	Попередження та передача ризику	Науковий консультант, директор	Стадія досліджень	Довший час для підбору оптимальних параметрів, консультації зі спеціалістом
Неправильно вибране обладнання, невдала технологія	Передача ризику	Технолог, науковий консультант	Стадія досліджень, впровадження у виробництво	Консультації з технологом
Невдале уточнення параметрів	Попередження ризику	Директор, науковий консультант		Уважна перевірка усіх розрахунків
Некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки	Передача ризику	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Проведення перепідготовки особисто
Невдало вибрані методи контролю	Передача ризику	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Обговорення вибору методів контролю із науковим консультантом
Занадто низька/висока ціна проекту. Проект не окупиться.	Передача ризику	Пакувальник-продажник, директор	Стадія продажу проекту	Перевірка розрахунків із досвідченим економістом

### **Висновки до розділу 3**

Бізнес ідея яка представлена в даній дисертації є потенційно вигідною за рахунок відсутності на світовому ринку та ринку України аналогів представленої продукції. Даний продукт забезпечує можливість вирощування сортів рослин у географічних зонах, досі непридатних для цього за показником інтенсивності впливу УФ-випроміннення.



## ВИСНОВКИ

Отже, *in vitro* на зразках отриманої сталої трансгенної рослини *Nicotiana tabacum* з експресією генів DesA та DesC ціанобактерій *Synechocystis* sp. PCC 6803 та *Synechococcus vulcanus*, було проведено ряд дослідів для підтвердження зміни адаптивної здатності організму до УВ внаслідок зміни спектру ЖК у складі клітинних мембран.

Отримані результати аналізів щодо рівня втрати електролітів досліджуваних зразків та активність в них ферменту супероксиддисмутази, свідчать про більшу адаптивну здатність трансгенного організму *Nicotiana tabacum* у порівнянні з контрольними зразками (N.T «дикого типу» та N.T із репортерним геном термостабільної ліхенази). Дослідження спектру ЖК у складі мембранних ліпідів зразків, виявило більший рівень накопичення ненасиченої ліноленової кислоти у рослині *Nicotiana tabacum* з генами DesA та DesC. Це дає змогу зробити висновок щодо впливу експресії генів десатураз ЖК ціанобактерій на збільшення пристосованості організму до надмірного впливу ультрафіолетового випромінювання.

За допомогою статистичної обробки та порівняння даних з контрольними зразками, стає можливим зробити висновок: рівень пошкоджень мембран у рослин, що експресують додаткові гени десатураз – нижчий, ніж у контрольних рослин. Як наслідок, рослини *Nicotiana tabacum*, трансформовані генами ацил-ліпідних десатураз, мають вищу адаптивну здатність до надмірного УВ.

Проект комерціалізації, представлений у даній дисертації, є потенційно вигідною за рахунок відсутності на світовому ринку та ринку України аналогів представленої продукції. Даний продукт забезпечує можливість вирощування сортів рослин у географічних зонах, досі непридатних для цього за показником інтенсивності впливу УФ-випромінювання.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кацан, Валентина Андріївна. Особливості дії препаратів екзогенних ДНК при отриманні нових форм тютюну : монографія / Валентина Андріївна Кацан, Анатолій Іванович Потопальський; В.о. Ін-т молекул. біології і генетики НАН України.– К. : Колобіг, 2007.– 41 с. ISBN 966-86103-4-9 : 10.00.
2. Кулуєв Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А. и др. Конститутивная экспрессия гена ARGOS в растениях табака под контролем промотора вируса мозаики георгина // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 3. С. 443–452.
3. Иванова Т.З., Рубан Э.В. Индуцированные мутации в селекции
4. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: высш. шк., 2008. – 710 с
5. 2. Диденко В.П., Диденко Т.В. Хлорофилльные мутанты табака, полученные методом химического мутагенеза // Химические супермутагены в селекции. – М.: «Наука». – 1975. – С. 298- 303
6. Kostandini, Genti & Mills, Bradford & Norton, George. (2006). The Potential Impact of Tobacco Biopharming: The Case of Human Serum Albumin. American Journal of Agricultural Economics. 88. 671-679. 10.1111/j.1467-8276.2006.00887.x.
7. Ganapathi, Thumballi & Penna, Suprasanna & Rao, P.S. & Bapat, Vishwas. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology. 3. 171-184.
8. Eriksen M; Mackay J; Schluger N; Gomeshtapeh FI; Drope J, 2015. The Tobacco Atlas, Fifth Edition. Atlanta, GA, USA: American Cancer Society
9. <https://tobaccoatlas.org/>

10. Hartana I; Vermeulen H, 2000. *Nicotiana tabacum* L. In: Plant Resources of South-East Asia (PROSEA) No. 16: Stimulants [ed. by Vossen vander, H. A. M. \Wessel, M.]. Leiden, Netherlands: Backhuys Publisher
11. Momtaz K. Wassef and James W. Hendrix. Lipid content of cured tobacco. *Canadian Journal of Botany*. **52**(5): 1123-1126. <https://doi.org/10.1139/b74-142>
12. P.N. Giannelos, F. Zannikos, S. Stournas, E. Lois, G. Anastopoulos, Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties, *Industrial Crops and Products*, Volume 16, Issue 1, 2002, Pages 1-9, ISSN 0926-6690, [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(02\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(02)00002-X).
13. Grisan, S., Polizzotto, R., Raiola, P. *et al.* Alternative use of tobacco as a sustainable crop for seed oil, biofuel, and biomass. *Agron. Sustain. Dev.* **36**, 55 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0395-5>
14. Vanhercke, T., El Tahchy, A., Liu, Q., Zhou, X.-R., Shrestha, P., Divi, U.K., Ral, J.-P., Mansour, M.P., Nichols, P.D., James, C.N., Horn, P.J., Chapman, K.D., Beaudoin, F., Ruiz-López, N., Larkin, P.J., de Feyter, R.C., Singh, S.P. and Petrie, J.R. (2013) Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnol. J.*, doi: [10.1111/pbi.12131](https://doi.org/10.1111/pbi.12131)
15. Vanhercke, T., El Tahchy, A., Liu, Q., Zhou, X.-R., Shrestha, P., Divi, U.K., Ral, J.-P., Mansour, M.P., Nichols, P.D., James, C.N., Horn, P.J., Chapman, K.D., Beaudoin, F., Ruiz-López, N., Larkin, P.J., de Feyter, R.C., Singh, S.P. and Petrie, J.R. (2013) Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnol. J.*, doi: [10.1111/pbi.12131](https://doi.org/10.1111/pbi.12131)
16. Meager A, 1998. *The molecular biology of cytokines*. *Molecular Medical Science Series*. Eds. James K and Morris A, John Wiley & Sons, London
17. Miele L, 1997. Plant bioreactors as hosts for biopharmaceuticals: Regulatory considerations. *TIBTECH*, 15: 45–50

18. Komarnytsky S, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Alam MZ and Raskin I, 2000. Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid. *Plant Physiol*, 124: 927–934
19. [\$245M Medicago Biotech Facility Begins Construction In Quebec City. URL: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/m-medicago-biotech-facility-begins-construction-in-quebec-city-0001>
20. Plant-based vaccines challenge big pharma for \$3 billion flu market. URL: <https://www.reuters.com/article/us-flu-vaccine-analysis-idUSKCN0HQ2YO20141001>
21. O’Keefe, B.R.; Vojdani, F.; Buffa, V.; Shattock, R.J.; Montefiori, D.C.; Bakke, J.; Mirsalis, J.; D’Andrea, A.L.; Hume, S.D.; Bratcher, B.; *et al.* Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6099–6104.
22. McLean MD (2017) Trastuzumab Made in Plants Using vivoXPRESS® Platform Technology. *J Drug Des Res* 4(5): 1052.
23. Ganapathi, T., P. Suprasanna, P. S. Rao and V. Bapat. “Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering.” *Indian Journal of Biotechnology* 3 (2004): 171-184.
24. Powell, J.D. From Pandemic Preparedness to Biofuel Production: Tobacco Finds Its Biotechnology Niche in North America. *Agriculture* **2015**, *5*, 901-917.
25. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир, 2002, 48-49
26. Gelvin, Stanton B. “Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool.” *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* vol. 67,1 (2003): 16-37, table of contents. doi:10.1128/membr.67.1.16-37.2003
27. Воронина М.В. Фитопатогенные бактерии рода *Agrobacterium*: генетическое разнообразие, диагностика, меры защиты Специальность

03.02.03 – микробиология 06.01.07 – защита растений, ФГАОУВО РУНДН, Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 2018 г – 180 с.

28. **Fortin, C., C. Marquis, E. W. Nester, and P. Dion.** 1993. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *J. Bacteriol.* 175:4790-4799.
29. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A. et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* . *Molec. Gen. Genet.* 163, 181–187 (1978). <https://doi.org/10.1007/BF00267408>
30. Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A. et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* . *Molec. Gen. Genet.* 163, 181–187 (1978). <https://doi.org/10.1007/BF00267408>
31. A. DePaolis. Localization of agropine-synthesizing functions in the TR Region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*1855 / DePaolis A., Mauro M.L., Pomponi M., Costantino P. et al. // *Plasmid.*—1985.—Vol.13.— P.1–7.
32. Risha Amilia Pratiwi and Muhammad Imam Surya (April 26th 2020). *Agrobacterium-Mediated Transformation, Genetic Transformation in Crops*, Kin-Ying To, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.91132
33. <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tekhniki>
34. Nehra, Narender S., et al. "Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system." *Plant Cell Reports* 9.6 (1990): 293-298.
35. Matthysse, A.G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Crit. Rev. Microbiol.* —1986.—Vol.13.—P.281–307.
36. W. (2014). *Agrobacterium: nature's genetic engineer*. *Front Plant Sci.* 5: 730. doi:10.3389/fpls.2014.00730
37. Ismagul, A., Yang, N., Maltseva, E. *et al.* A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. *BMC Plant Biol* **18**, 135 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1326-1>

38. Wang K, Frame B. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. *Methods Mol Biol.* 2009;526:29–45.
39. Maas C, Werr W. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Rep.* 1989;8:148–51.
40. Du, X., Wang, J., Zhou, Q., Zhang, L., Wang, S., Zhang, Z. and Yao, C. (2018). Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Deliv.* 25(1): 1516-1525. doi:10.1080/10717544.2018.1480674
41. Kyrpa-Nesmiian T.M.; Physiological and biochemical characteristics of nicotiana tabacum plants, carrying cyanobacterium  $\delta 9$ - and  $\delta 12$ -acyl-lipid desaturases genes, grown *In vivo* at frost conditions; ISSN 2219-3782. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Том 19
42. Wang Y, Ji J, Bu H, Zhao Y, Xu Y, Johnson CH, Kolár J. [Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. by *Agrobacterium tumefaciens* carrying genes in the melatonin biosynthesis pathway and the enhancement of antioxidative capability in transgenic plants]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2009 Jul;25(7):1014-21. Chinese. PMID: 19835142
43. J. Gubiš, R. Vaňková, V. Červená, M. Dragúňová, M. Hudcovicová, H. Lichtnerová, T. Dokupil, Z. Jureková, Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought, *South African Journal of Botany*, Volume 73, Issue 4, 2007, Pages 505-511, ISSN 0254-6299
44. Los D.A., Murata N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – 1666. – P. 142–157
45. Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J. R. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. – *Preslia* 86: 295–335
46. Barker G. L. A., Hayes P. K., O'Mahony S. L., Vacharapiyasophon P. & Walsby A. E. (1999): A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic Sea. – *J. Phycol.* 35: 931–937.
47. Ferris, M. J. and B. Palenik. 1998. Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature.* 396:226-228.

48. The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains: A review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Electronmicrograph-of-a-Synechococcus-PCC7002-cell-in-cross-section-A-and-longitudinal\\_fig1\\_237166291](https://www.researchgate.net/figure/Electronmicrograph-of-a-Synechococcus-PCC7002-cell-in-cross-section-A-and-longitudinal_fig1_237166291) [accessed 8 Dec, 2020]]

49. Dvořák, Petr; Casamatta, Dale A.; Pouličková, Aloisie; Hašler, Petr; Ondřej, Vladan; Sanges, Remo (2014-11-01). "Synechococcus: 3 billion years of global dominance". *Molecular Ecology*. 23 (22): 5538–5551. doi:10.1111/mec.12948. ISSN 1365-294X. PMID 25283338.

50. Shen G, Boussiba S, Vermaas WF (December 1993). "*Synechocystis* sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function". *The Plant Cell*. 5 (12): 1853–63. doi:10.1105/tpc.5.12.1853. PMC 160410. PMID 8305875.

51. [https://www.researchgate.net/figure/Conventional-SEM-images-of-Synechocystis-sp-PCC-6803-prepared-by-chemical-fixation\\_fig3\\_264134758](https://www.researchgate.net/figure/Conventional-SEM-images-of-Synechocystis-sp-PCC-6803-prepared-by-chemical-fixation_fig3_264134758)

52. Los D.A., Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1998. – 1394. – P. 3–15.]

53. Dmitry A. Los, Norio Murata, Structure and expression of fatty acid desaturases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, Volume 1394, Issue 1, 1998, Pages 3-15, ISSN 0005-2760

54. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // *FEBS Letters*. – 2006. – Vol. 580. – P. 5477–5483

55. Thelen J.J., Ohlrogge J.B. Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants // *Metabolic Engineering* – 2002. – Vol. 4. – P. 12-21.

56. 3. Los D.A., Ray M.K., Murata N. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 25. P. 1167—1175.

57. Macartney A.I., Maresca B., Cossins A.R. Temperature Adaptation of Bio) logical Membranes / Ed. A.R.Cossins. London: Portland Press. 1994. P. 129—139.

58. Panpoom S., Los D.A., Murata N. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1390. P. 323—332.
59. Кирпа-Несміян Т.М. "Фізіолого-біохімічна характеристика рослин *Nicotiana tabacum*, що несуть гени  $\Delta 9$ - та  $\Delta 12$ -ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій вирощених *in vivo* в умовах заморозків". *Фактори експериментальної еволюції організмів*. (2016): 139-143
60. Zarka, Daniel G., et al. "Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature." *Plant Physiology* 133.2 (2003): 910-918.
61. Prasher, Douglas C., et al. "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein." *Gene* 111.2 (1992): 229-233
62. Герасименко И. М., Сахно Л. А, Кирпа Т. Н., Остапчук А. Н., Хаджиев Т. А., Голденкова-Павлова И. В., Шелудько Ю. В. "Характеристика растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих гибридные гены  $\Delta 9$  или  $\Delta 12$ -ацил-липидных десатураз цианобактерий и термостабильной лихеназы". *Физиология растений*. 62. (2015): 1–10
63. Nehra, Narender S., et al. "Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system." *Plant Cell Reports* 9.6 (1990): 293-298.
64. Clough, Steven J., and Andrew F. Bent. "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *The plant journal* 16.6 (1998): 735-743
65. Valvekens, Dirk, Marc Van Montagu, and Mieke Van Lijsebettens. "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85.15 (1988): 5536-5540.
66. Kravets, A. P., et al. "Corn plant DNA methylation pattern changes at UV-C irradiation fractionating." *Cytology and genetics* 47.1 (2013): 29-33



67. Кирпа-Несміян Т.М. “Дослідження успадкування гена  $\Delta 9$ -ацил-ліпідної десатурази ціанобактерії у рослин тютюну Т1 покоління”. *Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції з міжнародною участю «Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience 2017»*. (2017): 254.
68. Piruzian, E., et al. "A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum*." *Molecular Genetics and Genomics* 266.5 (2002): 778-786.].
69. Дученко, М. А. "Дослідження полісахаридів листя гледичії колючої." *Український біофармацевтичний журнал* 3 (2014): 64-66.
70. Smith, P. K, et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* 150.1 (1985): 76-85
71. Кирпа Т. М., и др" Создание растений орхидеи *Dendrobium linguella* RCHB. F., экспрессирующих ген  $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии". *Тези матер. XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів»*. (2012): 265-266.
72. Fried, Rainer. "Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase." *Biochimie* 57.5 (1975): 657-660.
73. Кирпа-Несміян, Т. М., та ін. "Вплив гіпертермічного стресу на рослини, що експресують гібридні гени  $\Delta$ -9-і  $\Delta$ -12-ацил-ліпідних десатураз ціанобактерій." *Фактори експериментальної еволюції організмів* 17 (2015): 197-199.
74. Kobayashi, Y., Nojima, Y., Sakamoto, T. *et al.* Comparative analysis of seven types of superoxide dismutases for their ability to respond to oxidative stress in *Bombyx mori*. *Sci Rep* **9**, 2170 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38384-8>
75. . Los D.A., Ray M.K., Murata N. // *Mol. Microbiol.* 1997. Vol. 25. P. 1167—1175.].